DIE FUNKTION DES MYO–INOSITS IN DER BIOSYNTHESE DER RAFFINOSE

Ludwig Lehle

1972

DIE FUNKTION DES MYO-INOSITS IN DER BIOSYNTHESE DER RAFFINOSE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Ludwig Lehle
aus
Regensburg

Januar 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M e i n e n E l t e r n

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Tanner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.1972

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 8

1. Versuchsobjekte 8

2. Isolierung und Reinigung der Galaktinol: Saccharose-6-Galaktosyltransferase 8
2.1. Bereitung des Rohextraktes 8
2.2. Fällung mit Protaminsulfat 9
2.3. Fraktionierung mit Ammoniumsulfat 9
2.4. Chromatographie auf DEAE-Cellulose 11
2.5. Gelfiltration über Sephadex G-200 12
2.6. Chromatographie auf Hydroxyapatit 12

3. Bestimmung der Enzymaktivität 13
3.1. Bestimmung der Syntheseaktivität 13
3.2. Bestimmung der Austauschreaktion 14
3.3. Bestimmung der α-Galaktosidase-aktivität 14

4. Trenn- und Meßverfahren 15
4.1. Chromatographie 15
4.2. Elektrophorese 15
4.3. Messung der Radioaktivität 15

5. Extraktion der löslichen Kohlenhydrate aus Weizenkeimlingen und Samen von Vicia faba für analytische Zwecke 16

6. Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen... 16
6.1. Analytische Sephadex G-200 16
6.2. Molekulargewichtsbestimmung durch Dichtegradientenzentrifugation 17

7. Weitere Methoden 17
7.1. Polyacrylamidgelelektrophorese 17
7.2. Proteinbestimmungen 18

8. Darstellung von ^{14}C-Saccharose und ^{14}C-Galaktinol 18

9. Chemikalien 18

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 19

1. Die Zusammensetzung der löslichen Kohlenhydrate in Weizenkeimlingen und in Samen von Vicia faba verschiedener Reifungsstadien 19

2. Die Biosynthese der Raffinose in vitro 22
2.1. Bildung von Raffinose in Rohextrakten aus Weizenkeimlingen und Samen von Vicia faba 22
2.2. Identifizierung der Reaktionsprodukte .. 27

3. Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase 27

4. Eigenschaften der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase 34
4.1. Acceptor- und Donatorspezifität 35
4.2. Enzymkinetik 38
4.3. Temperaturabhängigkeit von Synthese- und Austauschreaktion 42
4.4. Stabilität der Transferase 43

4.5. pH-Abhängigkeit von Synthese- und Austauschreaktion 46
4.6. Einfluß von SH-Schutzmitteln auf Raffinosesynthese, Austauschreaktion und Stachyosesynthese 47
4.7. Hemmung der enzymatischen Aktivität durch SH-Gifte und Schwermetallionen ... 50
4.8. Bestimmung des Molekulargewichtes der Transferase mit Sephadex Gel G-200 Chromatographie und Dichtegradienten-zentrifugation 52

5. Anreicherungsversuche durch Chromatographie auf Hydroxyapatit und deren Problematik 55

6. Reinheit der Enzympräparation 58

IV. SCHLUSSBETRACHTUNG 61

V. ZUSAMMENFASSUNG 68

VI. LITERATURVERZEICHNIS 71

I. EINLEITUNG

Die wichtigsten Reservestoffe und Energielieferanten der Pflanzen sind die Kohlenhydrate. Deren Stoffwechsel und Speicherung bildete deshalb schon immer einen bedeutsamen Gegenstand pflanzenphysiologischer Forschung. Ältere Untersuchungen hierüber beschäftigten sich neben der Stärke im wesentlichen mit den Monosacchariden und allenfalls den Disacchariden. Dagegen fanden andere vegetabilische Zucker wenig Beachtung, sie wurden als Seltenheit betrachtet und ihre Rolle im Stoffwechsel wurde kaum erkannt. Hier führte erst die Verfeinerung der Untersuchungsmethoden, vor allem auf dem Gebiet der Chromatographie und der Isotopentechnik, zu einer Vertiefung und Ausweitung des Wissens.

In besonderem Maß trifft dies für die Kenntnisse über die Oligosaccharide zu, vorzüglich auch für die im Pflanzenreich weit verbreiteten Zucker der Raffinosefamilie (9, 17, 51). Es handelt sich hierbei um eine homologe Reihe von α-Galaktosiden der Saccharose. Das Anfangsglied ist die Raffinose, welche erstmals 1843 von Johnston (zit. nach 17) aus dem Manna verschiedener Eucalyptusarten isoliert und deren Struktur als O-α-D-Galaktopyranosyl-(1⟶6)-O-α-D-glucopyranosyl-(1⟶2)-ß-D-fructopyranosid sichergestellt wurde (6, 13). Die übrigen Glieder entstehen formal durch fortgesetzte α-glykosidische Bindung von je einem Molekül Galaktose mit dem C_6-atom der vorhergehenden Galaktose gemäß der in Abb. 1 dargestellten Formel.

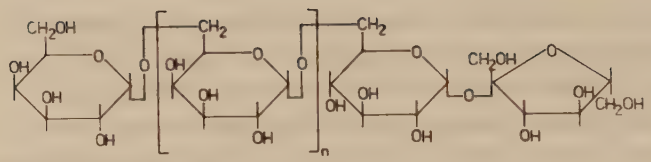


Abb. 1 . Struktur der Raffinosefamilie

Nach den bisherigen Kenntnissen kann n zwischen 0 und 6 liegen (9, 22, 23, 24). Für die niedermolekularen Verbindungen sind allgemein Trivialnamen gebräuchlich: Raffinose (n=0), Stachyose (n=1), Verbascose (n=2) und Ajugose (n=3). Obwohl die Struktur nur bis einschließlich Ajugose eindeutig aufgeklärt ist (9, 11, 13 22, 23, 64), kann man annehmen, daß auch die höheren Glieder sich von der Raffinose ableiten, da sich diese Zucker in ein- und derselben Pflanze finden lassen (52).

Die Raffinosezucker sind außer in Algen und Pilzen im ganzen Pflanzenreich verbreitet.
Sie finden sich vor allem in Speicherorganen wie Samen (16), Sproßknollen, Wurzeln und Rhizomen (9, 53) und können in größeren Mengen als die Saccharose auftreten. Auch über das Vorkommen von Raffinosezuckern in oberirdischen Organen wurde berichtet. Zimmermann (66, 67) fand sie als wesent-

lichen Bestandteil des Siebröhrensaftes bei dem größten Teil von über 250 untersuchten Pflanzenarten aus 55 Familien. Lediglich bei Vertretern der Leguminosen konnten keine Raffinosezucker in den Exudaten gefunden werden. Jeremias (25, 26), sowie Senser und Kandler (47) wiesen in zahlreichen Untersuchungen das Auftreten dieser Oligosaccharide in Laub- und wintergrünen Blättern nach. Auch aus Knospen und Pollen konnten sie isoliert werden (39, 63).

Ebenso mannigfaltig wie das Vorkommen und die Verbreitung der Raffinosezucker ist auch ihre biologische Funktion. Durch zahlreiche Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Raffinosezucker in späteren Reifestadien in Samen angereichert und bei der Keimung rasch mobilisiert werden (31, 42, 49, 52, 60). Deshalb sind sie als Reservekohlenhydrate anzusehen, aus denen Monosaccharide sowohl für katabolische Prozesse als auch zur Synthese neuen Zellwandmaterials freigesetzt werden können (10, 61). Eine zweite Funktion scheinen die Raffinosezucker für die Frostresistenz zu haben (32, 33, 37). Eine Erhöhung des osmotischen Wertes der Zelle und damit eine Erniedrigung des Gefrierpunktes, bedingt durch das winterliche Ansteigen des Gesamtzuckergehaltes im vegetativen Bereich, insbesondere eben an Zuckern der Raffinosefamilie, verbunden mit einem Absinken des Stärkegehaltes, soll eine der Ursachen für die Frostresistenz sein. Nicht zuletzt sei auf ihre Bedeutung als Transportstoffe hingewiesen. Zimmermann konnte 1957 (68, 69) nachweisen, daß die Trockensubstanz des Siebröhrensaftes oft bis zu 90% an Oligosacchariden enthält.

Während über Vorkommen und Verbreitung der Raffinosezucker inzwischen eine Vielzahl von Ergebnissen vorliegt, stand man beim Studium ihrer Biosynthese bis vor kurzem erst am Anfang.
Seit der Entdeckung von Uridindiphosphat-Glucose durch Leloir und Mitarbeiter im Jahre 1950 (29) und seiner Beteiligung bei der Biosynthese von Saccharose (5, 30), konnte in den folgenden Jahren ganz allgemein gezeigt werden, daß Zuckernukleotide sowohl im pflanzlichen als auch tierischen Organismus die Vorläufer komplexer Saccharide darstellen. Es lag nun nahe, dies auch für die Raffinosezucker zu vermuten.

Tatsächlich konnten Bourne, Walter und Pridham (3) Raffinose in vitro aus Saccharose, Galaktose-1-Phosphat und UDP mit einem Rohextrakt aus ruhenden Samen von Vicia faba synthetisieren. Eine direkte Übertragung der Galaktose von UDP-Galaktose auf Saccharose wurde erstmals von Pridham und Hassid (44) mit einer Enzympräparation aus reifen Samen von Vicia faba beschrieben. Auch Gomyo und Nakamura (20) haben berichtet, Raffinose aus UDP-Galaktose und Saccharose synthetisiert zu haben. Eigene Versuche, eine Übertragung von UDP-Galaktose nachzuweisen, schlugen fehl; negative Ergebnisse wurden auch von Moreno und Cardini (40), von Frydman und Neufeld (18), sowie von Shiroya (49) berichtet.

Dagegen war aus einer von Senser und Kandler (46, 47) breit angelegten Versuchsreihe zur photosynthetischen $^{14}CO_2$-fixierung zu folgern, daß nicht Zuckernukleotide, sondern eher Galaktinol ein möglicher Galaktosyldonator für die Biosynthese der Raffinosezucker sein könnte.
Galaktinol ist ein α-Galaktosid des myo-Inosits (L-1-(O-α-D-Galaktopyranosyl)-myo-Inosit) und wurde erstmals von Brown und Serro 1953 (4) aus Zuckerrüben isoliert.

Seine Struktur (Abb. 2) wurde noch im gleichen Jahr von Kabat und Mitarbeitern (27) aufgeklärt. Die Biosynthese wurde später von Frydman und Neufeld (18) studiert.

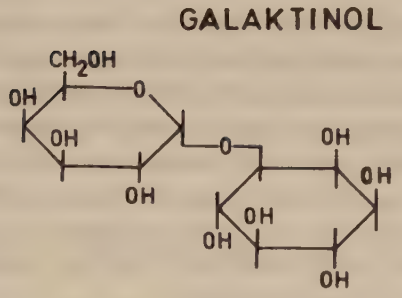


Abb. 2. Struktur des Galaktinols

Die Ergebnisse von Senser und Kandler (46, 47) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In allen Blättern, in denen Zucker der Raffinosefamilie vorkamen, war auch Galaktinol nachzuweisen. Es wurden über 60 Arten aus 12 Familien untersucht.
2. Bei Photosynthese in einem $^{14}CO_2$-Luftgemisch ist der Pool an Galaktinol sehr viel früher an ^{14}C gesättigt als die Zucker der Raffinosefamilie.
3. Bei Nachbehandlung mit nichtradioaktivem CO_2 nach vorheriger $^{14}CO_2$-fixierung nimmt der prozentuale Anteil der Aktivität in Raffinose und insbesondere in Stachyose weiter zu, während er im Galaktinol rasch abnimmt. Die gleichen Verhältnisse sind zu beobachten, wenn das Blatt nach Photosynthese in $^{14}CO_2$ verdunkelt wird. Galaktinol

zeigt somit einen Umsatz.

4. Nach kurzen Photosynthesezeiten findet sich die höchste spezifische Aktivität jeweils in der endständigen Galaktose der Raffinose oder Stachyose. Galaktinol selbst ist anfangs (<4 Std) fast ausschließlich im Galaktoseteil markiert.

Die einfachste Interpretation dieser Beobachtungen war, dem Galaktinol die Funktion eines Galaktosyldonators in der Biosynthese der Raffinosezucker zuzuschreiben.

In Einklang damit stehen auch die Untersuchungen von Tanner, Seifarth und Kandler (60) über den Umsatz der Oligosaccharide in reifenden und keimenden Samen von Phaseolus vulgaris. Aus diesen Versuchen ließ sich der Schluß ziehen, daß die Zucker der Raffinosefamilie in den reifenden Bohnen de novo synthetisiert werden, und ihrer Bildung das Auftreten von Galaktinol vorausgeht, bzw. daß Galaktinol das typische Verhalten eines Vorläufers zeigt.

Die enzymatische Übertragung einer Galaktose von Galaktinol auf einen entsprechenden Acceptor für die Bildung eines Raffinosezuckers in vitro konnte erstmals mit Extrakten aus Phaseolus vulgaris für die Biosynthese von Stachyose gezeigt werden (57). Kurz darauf gelang auch die Biosynthese der Verbascose, dem nächst höheren homologen Zucker, unter Vermittlung von Galaktinol (59). In diesem Fall wurde Stachyose als Galaktosylacceptor eingesetzt.

(1) Galaktinol + Raffinose $\rightleftharpoons$ Stachyose + myo-Inosit
(2) Galaktinol + Stachyose $\rightleftharpoons$ Verbascose + myo-Inosit

Der in der Reaktion freiwerdende Inosit wird mit UDP-Galaktose wieder in Galaktinol übergeführt (58).

Damit erhielt nun das Galaktinol, das man seit seiner Entdeckung als einen sekundären Pflanzenstoff betrachtete, plötzlich eine bedeutende Funktion im Primärstoffwechsel der Pflanze, wobei dem Inosit die Rolle eines Cofaktors zukommt.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, eine mögliche Beteiligung von Galaktinol auch bei der Biosynthese der Raffinose nachzuweisen.
Wie bereits oben ausführlich dargelegt, sprechen dafür einmal zahlreiche physiologische Untersuchungen (46, 60). Zum anderen konnten Moreno und Cardini ein Enzym aus Weizenkeimlingen isolieren, das eine Austauschreaktion zwischen Raffinose und Saccharose gemäß folgender Gleichung katalysiert:

(3) Raffinose + ^{14}C-Saccharose $\rightleftharpoons$ ^{14}C-Raffinose + Saccharose

Diese Reaktion ist völlig analog einer von Tanner und Kandler (58) beschriebenen, durch die Galaktinol:Raffinose-6-Galaktosyltransferase ("Stachyoseenzym") katalysierten Austauschreaktion zwischen Raffinose und Stachyose.

Als Arbeitshypothese wurde daher angenommen, daß analog Gleichung (1) und (2) der Galaktosylrest des Galaktinols auch auf Saccharose übertragen werden kann.

(4) Galaktinol + Saccharose $\rightleftharpoons$ Raffinose + myo-Inosit

Als Versuchsmaterial boten sich zunächst Weizenkeimlinge an, da sie die genannte Austauschreaktion katalysieren und, wie später gezeigt wird, eine beträchtliche Menge an Galaktinol enthalten, ohne daß, außer Raffinose selbst, noch weitere Zucker der Raffinosefamilie papierchromatographisch gefunden werden können.
Darüber hinaus sollten für eine vergleichende Betrachtung von Raffinose-, Stachyose- und Verbascosesynthese auch Samen von Vicia faba herangezogen werden,

da mit diesen bereits erfolgreiche in vitro Versuche bezüglich der Biosynthese von Stachyose und Verbascose durchgeführt worden waren (57, 58, 59).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsobjekte

Zur Durchführung der Versuche wurden Weizenkeimlinge und Samen von Vicia faba verwendet.
Die Weizenkeimlinge stammten aus einer Weizen- und Roggenmühle.
Vicia faba Samen, sowohl reife als auch reifende, wurden zu den entsprechenden Zeiten von einem Feld geerntet. In den reifen Samen konnte noch nach einem Jahr Enzymaktivität gefunden werden.

2. Isolierung und Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase.

Alle Reinigungsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt. Bei Phosphatpuffern wurde immer das Kaliumsalz verwendet.

2.1. Bereitung des Rohextraktes.

In Vorversuchen erwies sich eine Zerkleinerung und anschließende Extraktion der Samen als die schonenste Methode. Es wurde daher auf folgende Weise verfahren: 200 g reife Samen wurden bei Zimmertemperatur in einem Starmix zermahlen und anschließend in einer gut gekühlten

Reibschale in 2 Portionen, mit jeweils 200 ml 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.3, und 0.005 M Clelands Reagenz (DTE) extrahiert. Das Homogenat wurde 30 Min. bei 27000xg zentrifugiert.

2.2. Fällung mit Protaminsulfat.

Zur Entfernung der Nucleinsäuren, der Fette und eines beträchtlichen Teils störender Begleitproteine, erwies sich eine Fällung mit Protaminsulfat als besonders vorteilhaft. Wie aus Vorversuchen hervorgeht (Abb. 3) war von einem Konzentrationsverhältnis von 9 mg Protaminsulfat pro 100 mg Protein eine gute Anreicherung zu erwarten.

Der erste Reinigungsschritt wurde folgendermaßen durchgeführt:
Der Rohextrakt wurde zuerst mit Extraktionspuffer auf eine Konzentration von 50 mg/ml verdünnt und anschließend langsam unter ständigem Rühren 2 %ige Protaminsulfatlösung, bis eine Endkonzentration von 9 mg/100 mg Protein erreicht war, hinzugetropft. Es wurde dann noch 30 Min. weitergerührt und das erhaltene Präzipitat 15 Min. bei 27000xg abzentrifugiert. Der klare, gelbliche Überstand wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

2.3. Fraktionierung mit Ammoniumsulfat.

Dieser Schritt wurde mit bei 0-4°C gesättigter Ammoniumsulfatlösung durchgeführt. Damit wird nicht nur eine schonendere Versuchsdurchführung gewährleistet, sondern es werden auch besser reproduzierbare Ergebnisse als mit festem Ammoniumsulfat erhalten.

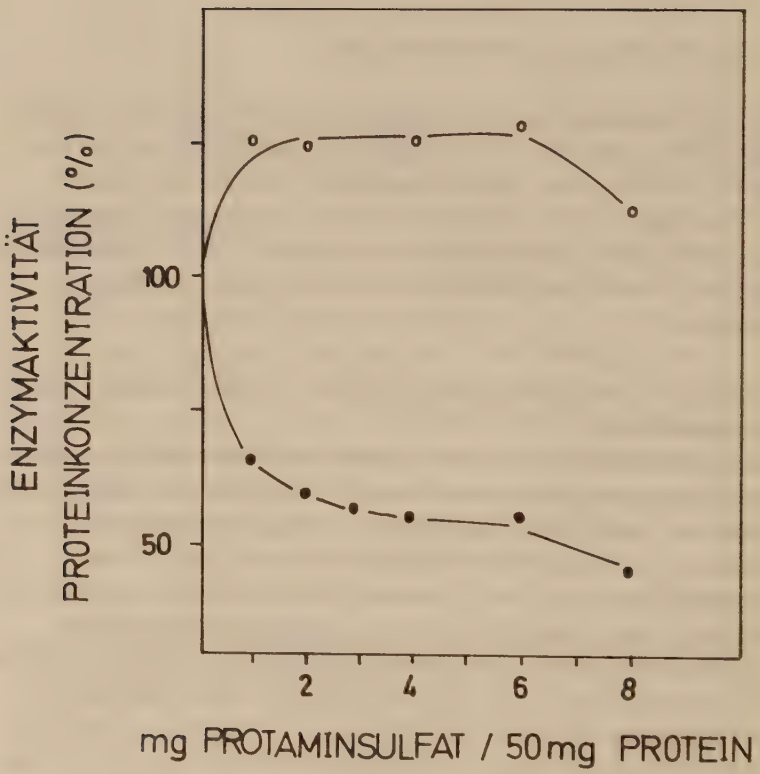


Abb. 5 . Einfluß steigender Mengen Protaminsulfat auf die Proteinkonzentration und die Transferase-aktivität.

●——● Protein

○——○ Syntheseaktivität

Der Protaminsulfatextrakt wurde langsam und unter ständigem Rühren auf eine Konzentration von 42% gebracht, und nach weiteren 30 Min. Rühren der Niederschlag bei 27000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in der gleichen Weise auf einen Sättigungsgrad von 55% gebracht. Nach 30 Min. wurde die Suspension 10 Min. bei 13000xg geklärt. Der so erhaltene Niederschlag wurde in einem Minimum (ca. 70 ml) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.3, der 0.005 M DTE enthielt, aufgenommen und gegen einen 50-fachen Überschuß an 0.05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5 mit 0.001 M DTE über Nacht dialysiert.

2.4. Chromatographie auf DEAE-Cellulose.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher. Das dialysierte Enzym wurde an einer DEAE-Cellulose Säule (2.5x40cm) adsorbiert. Diese war vorher mit 0.01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, der 0.05 M KCl und 0.001 M DTE enthielt, äquilibriert worden. Dann wurde die Säule mit Äquilibrationspuffer gewaschen, bis ein nachgeschalteter Durchflußanalysator (Wellenlänge 280 mμ) Proteinfreiheit des Eluats anzeigte. Nachfolgende Desorption erfolgte mit einem linearen Kaliumchlorid-gradienten von 0.05 M KCl bis 0.2 M KCl in 0.01 M Tris-HCl-Puffer mit 0.001 M DTE. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 1 Liter, die Tropfgeschwindigkeit etwa 30 ml pro Stunde. Fraktionen von 6 ml wurden gesammelt; jene mit der höchsten spezifischen Aktivität wurden vereinigt und in einer Amicon Ultrafiltrationszelle (Filter XM-50) auf ein kleines Volumen eingeengt.

2.5. Gelfiltration über Sephadex G-200.

Sephadex G-200 wurde in 0.01 M Tris-HCl-Puffer, der 0.1 M KCl enthielt nach der Vorschrift des Herstellers gequollen und eine Säule von 2.5x80 cm gegossen. Vor Benützung wurde sie jeweils mehrere Tage mit obigem Puffer, der aber zusätzlich 0.002 M DTE enthielt, gewaschen. Die eingeengte Proteinlösung wurde dann durch vorsichtiges Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Die Eluation erfolgte bei einer konstanten Durchflußrate von 4 ml pro Stunde. 2 ml Fraktionen wurden gesammelt, die aktiven Fraktionen vereinigt und wie oben beschrieben in einer Ultrafiltrationszelle eingeengt.

2.6. Chromatographie auf Hydroxyapatit.

Eine weitere Reinigung wurde mit Hydroxyapatit durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung gegen 0.01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, der 0.002 M DTE enthielt, dialysiert. Die Hydroxyapatitsäule (2.5x13cm) war vor Gebrauch mit dem dreifachen Volumen an 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.5, regeneriert und mit 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.5 und 0.002 M DTE aquilibriert worden. Nach dem Auftragen des dialysierten Proteins wurde mit einem Stufengradienten eluiert. Folgende Phosphatpuffer, pH 7.5, wurden verwendet:
a) 100 ml 0.01 M; b) 100 ml 0.05 M;
c) 100 ml 0.1 M; u. d) 100 ml 0.2 M.
Die aktiven Fraktionen wurden dann wieder wie oben beschrieben eingeengt.

3. Bestimmung der Enzymaktivität.

3.1. Bestimmung der Syntheseaktivität.

Die Fähigkeit der Transferase den Galaktosylrest von Galaktinol auf Saccharose zu übertragen (Synthesereaktion) wurde auf zwei verschiedene Arten getestet.

Test I beruht auf der Messung von ^{14}C-Raffinose, welche durch Übertragung der Galaktose auf ^{14}C-Saccharose entstand.

$$\text{Galaktinol} + {}^{14}\text{C-Saccharose} \rightleftharpoons {}^{14}\text{C-Raffinose} + \text{myo-Inosit}$$

Die Reaktion wurde in kleinen Fiolaxgläsern ausgeführt. Der Ansatz enthält in einem Endvolumen von 50 µl: 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2, 1.0 µMol Galaktinol, 0.02 µMol ^{14}C-Saccharose (35 µCi/µMol) und Enzym. Nach Inkubation von 1-4 Stunden bei 32°C wurde die Reaktion mit 0.2 ml Äthanol gestoppt, das ausfallende Protein abzentrifugiert und der Überstand papierchromatographisch in Lösungsmittel A aufgetrennt. Dieser typische Testansatz wurde verschiedentlich je nach Versuchszweck abgeändert.

In Test II wird die Radioaktivität gemessen, die durch die Übertragung des ^{14}C-Galaktosylrests von ^{14}C-Galaktinol auf Saccharose in Raffinose erscheint.

$$^{14}\text{C-Galaktinol} + \text{Saccharose} \rightleftharpoons {}^{14}\text{C-Raffinose} + {}^{14}\text{C-myo-Inosit}$$

Mit diesem Test läßt sich außerdem die Menge an freigesetzter ^{14}C-Galaktose bestimmen, die durch die hydrolytische Aktivität der Transferase (Übertragung auf Wasser) gebildet wird, bzw. durch die Einwirkung vorhandener α-Galaktosidase entsteht.
Der Testansatz enthielt in 50 µl Endvolumen: 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2, 0.013 µMol ^{14}C-Galaktinol (7 µCi/µMol), 0.5 µMol Saccharose und Enzym. Die Versuchsdurchführung entsprach Test I.

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte geschah jedoch durch Chromatographie in Lösungsmittel B, gefolgt von einer zweiten eindimensionalen Entwicklung in Lösungsmittel A.

3.2. Bestimmung der Austauschreaktion.

Die Enzympräparation katalysiert auch die Übertragung des Galaktosylrestes von Raffinose auf Saccharose, um erneut Raffinose zu ergeben, gemäß folgender Gleichung (Austauschreaktion):

$$\text{Raffinose} + {}^{14}\text{C-Saccharose} \rightleftharpoons {}^{14}\text{C-Raffinose} + \text{Saccharose}$$

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl: 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2, 0.5 µMol Raffinose, 0.02 µMol ^{14}C-Saccharose (35 µCi/µMol) und Enzym. Die Durchführung erfolgte wie in Test I.

3.3. Bestimmung der α-Galaktosidaseaktivität.

Für die Erfassung der α-Galaktosidase wurde ein Test mit p-Nitrophenyl-α-Galaktose als Substrat verwendet. Die nach einer gewissen Zeit freigesetzte p-Nitrophenyl-Menge ist proportional der Galaktosidaseaktivität und kann nach Zugabe von Na_2CO_3 auf Grund der gelben Farbe im alkalischen Bereich bei 405 mµ bestimmt werden.
Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.4 ml: 25 µMol Kaliumphosphatpuffer, pH 5.5, 6.0 µMol α-PNPG und Enzym. Die Reaktion wurde nach Inkubation von 15 Minuten bei 32°C mit 5 ml eiskalter 0.1 M Na_2CO_3-Lösung gestoppt und die entstandene Farbe sofort bei 405 mµ gemessen. Kontrollen wurden sowohl mit α-PNPG als auch mit Protein allein durchgeführt.

4. Trenn- und Meßverfahren

4.1. Chromatographie.

Die chromatographische Auftrennung der Zucker erfolgte größtenteils eindimensional; für manche Fragestellung mußte auch zweidimensional in zwei verschiedenen Lösungsmitteln entwickelt werden. Es wurde Whatman Papier Nr. 1 im Format 46cm x 57cm verwendet und absteigend chromatographiert. Als Laufmittel wurden benützt (V/V):

A) n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (60:40:3:30)
B) α-Picolin/Ammoniak/Wasser (70:28:2)
C) n-Butanol/Äthylacetat/Eisessig/Wasser (40:30:25:40)
D) 88% Phenol/Wasser/1M Na_2EDTA/Eisessig (840:160:1:10)
E) n-Butanol-Wasser (Lsg. 1):Propionsäure-Wasser (Lsg. 2) (1:1)
Lsg. 1 : n-Butanol/Wasser (750:50)
Lsg. 2 : Propionsäure/Wasser (352:448)

Als Sprühreagenzien wurden verwendet:
1. Reagenz nach Trevelyan et al. auf reduzierende Zucker und Verbindungen mit vicinalen Hydroxylgruppen (62)
2. Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz nach Bailey (2) auf Zucker.

4.2. Elektrophorese.

Elektrophoretische Trennungen wurden auf Whatman Papier Nr. 1 bei 700 Volt ausgeführt. Die Trennzeit betrug 4-6 Stunden. Als Puffer wurde 0.05 M Natriumborat, pH 9.2, verwendet.

4.3. Messung der Radioaktivität.

Die Lokalisierung der radioaktiven Verbindungen erfolgte in der Regel mit Hilfe eines Streifenzählers, im übrigen durch Radioautographie. Bei der zweitgenannten Methode wurden die Chromatogramme jeweils auf Agfa-Röntgenpapier

aufgelegt. Die Expositionszeit wurde so gewählt, daß 0.5-1% der Gesamtaktivität eine sichtbare Schwärzung ergaben (Flecken mit 100 Ipm sind nach etwa 2 Wochen sichtbar).

Die Messung der Radioaktivität erfolgte direkt am Papier in einem Toluol/2.5-Diphenyloxazolgemisch (5g/l) mit einem Szintillationszähler (Beckmann LS 100). Die Zählausbeute betrug etwa 70%. Gelegentlich erfolgte die Auswertung auch mit einem Methandurchfluß-zählrohr FH 407A der Fa. Frieseke und Höpfner. Die Zählausbeute betrug in diesem Fall nur 7%.

5. Extraktion der löslichen Kohlenhydrate aus Weizenkeimlingen und Samen von Vicia faba für analytische Zwecke.

5 g Samen oder Weizenkeimlinge wurden in einer Reibschale zuerst zerkleinert und dann mit 15 ml 80% Äthanol zu einem homogenen Brei zerrieben. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 Min. bei 17000xg), der Rückstand zweimal mit 20% Äthanol und zweimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden unter Vakuum in einem Rotationsverdampfer bei 40°C auf 2,5 ml eingeengt und davon verschiedene µl-Mengen ein- und zweidimensional chromatographiert.

6. Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen.

6.1. Analytische Sephadex G-200

Diese Methode wurde nach Andrews (1) an einer Sephadex-G-200 Säule (2.5x80cm) durchgeführt. Zur Aufstellung einer Eichkurve dienten folgende Vergleichsproteine (in Klammern ist jeweils das ent-

sprechende Molekulargewicht angegeben):
Katalase (230000), Aldolase (147000), Rinderserumalbumin (67000), Ovalbumin (45000), Chymotrypsinogen (25000). Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml pro Stunde wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt.

6.2. Molekulargewichtsbestimmung durch Dichtegradientenzentrifugation.

Als eine zweite Methode wurde die Dichtegradientenzentrifugation nach Martin und Ames (36) verwendet. Da mit einem üblicherweise verwendeten Saccharosegradienten eine Wechselwirkung zwischen Enzym und Saccharose (Substrat!) befürchtet wurde, mußte die Methode abgewandelt werden. Es wurde ein linearer Gradient von 5-20% Glycerin in 0.05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, und 0.005 M DTE verwendet. Die vorgekühlten 5 ml Gradienten wurden mit 0.1 ml Probe und 0.1 ml Aldolase als Vergleichsprotein vorsichtig überlagert und 16 Stunden bei 40000 UpM und 0°C im SW50L Rotor in einer Spinco L 2-65B zentrifugiert. Der Becher wurde anschließend am Boden angestochen und der Inhalt über eine LKB-Peristaltikpumpe (16 ml/Std) und einem Fraktionskollektor in 3 Tropfenfraktionen entleert.

7. Weitere Methoden

7.1. Polyacrylamidelektrophorese.

Die Gelelektrophorese wurde nach Maurer (38) mit einem 7.5 %igen Gel des Gelsystems Nr. 1 ausgeführt. Die Röhrchen waren 10 cm lang bei einem Durchmesser von 5 mm. Der Stromfluß betrug 2mA pro Röhrchen. Als Elektrolysepuffer diente Tris-Glycin, pH 8.3. Gefärbt wurden die Gele mit 0.25 %igem Coomassieblau nach Chrambach et al. (7). Die Entfärbung geschah mit 12 %iger Trichloressigsäure.

7.2. Proteinbestimmungen.

In der Regel erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (34). Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet. Für grobe Bestimmungen wurde auch die Messung der Trübung bei 540 mμ nach TCA-ausfällung herangezogen (50).

8. Darstellung von ^{14}C-Saccharose und ^{14}C-Galaktinol.

Zu diesem Zweck fixierten einzelne junge Blätter von Lamium album in der bei Kandler 1964 (28) beschriebenen Anlage eine Stunde lang photosynthetisch $^{14}CO_2$. Das radioaktiv entstandene Galaktinol bzw. die radioaktive Saccharose wurden aus dem wasserlöslichen Extrakt isoliert und chromatographisch gereinigt. Es wurden die Laufmittel A, D und E verwendet. Die Galaktosehälfte des Galaktinols enthält etwa 95% der Gesamtaktivität (1 Std. Hydrolyse bei 100°C in 1 N HCl).

9. Chemikalien.

Sämtliche Chemikalien waren von höchstmöglicher Reinheit.

Zur Reinigung des Enzyms wurden verwendet: Protaminsulfat, DEAE-Cellulose von Serva; Sephadex G-200 von Pharmacia, Hydroxyapatit (Bio-Gel HT) von Bio-Rad-Laboratories.

Clelands Reagenz (DTT oder DTE) lieferte Calbiochem oder Merck.

Stachyose wurde von Serva, Raffinose von Schuchart, Stachyose und p-Nitrophenyl-α-D-Galaktose von Sigma Chem. Corp. bezogen.

Ebenfalls von Sigma stammte p-Chloromercuribenzoat. Emulsin wurde bei Nutritional Biochemical Corporation

gekauft.

Die Eichproteine, sowie Tris stammten von Boehringer.

Die Isotopen ^{14}C-myo-Inosit (160 mCi/mMol) und ^{14}C-Saccharose (600 mCi/mMol) wurden von The Radiochemical Centre (Amersham, England) gekauft.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Die Zusammensetzung der löslichen Kohlenhydrate in Weizenkeimlingen und in Samen von Vicia faba verschiedener Reifungsstadien.

Auf der Suche nach einem geeigneten Objekt für unsere in vitro Versuche war folgende Überlegung von Bedeutung: Wenn dem Galaktinol die Funktion eines Galaktoseüberträgers zukommt, dann wäre diese möglicherweise am ehesten dort nachzuweisen, wo neben Galaktinol nur Raffinose, jedoch keiner der übrigen Raffinosezucker als galaktosehaltiges Oligosaccharid auftritt.

Wie Abb. 4 zeigt, liegt eine derartige Kohlenhydratzusammensetzung bei Weizenkeimlingen vor. Die ein- und zweidimensionale chromatographische Auftrennung eines Alkoholextraktes in Lösungsmittel C bzw. A und E ergab folgende Komponenten:

Monosaccharide : Fructose, Glukose
Disaccharide : Saccharose
Cyclite : Inosit, Galaktinol
Zucker der Raffinosefamilie: Raffinose

In Abbildung 5 ist die Verteilung eines Samenextraktes aus reifen Vicia faba-Samen, dem zweiten Untersuchungsobjekt, wiedergegeben. Hier treten neben Raffinose als weitere galaktosehaltige Oligosaccharide auch deren höhere Homologe Stachyose, Verbascose und Ajugose auf, was sich auch in der Enzymausstattung (siehe später) widerspiegelt.

Von Vicia faba wurden ferner Extrakte von Samen verschiedener Reifungsstadien untersucht. Während in ganz jungen Samen (Samenlänge 2mm) nur Mono- und Disaccharide gefunden wurden, treten in einem zweiten Stadium (Samenlänge 5mm) auch Inosit und Galaktinol auf. Auf Grund der Intensität der Braunfärbung und der Größe der Flecken auf den Chromatogrammen kann geschlossen werden, daß das Maximum der auftretenden Insitmenge zeitlich vor dem des Galaktinols liegt. Das Vorkommen der Zucker der Raffinosefamilie ist dagegen auf spätere Stadien beschränkt und mit einem gleichzeitigen Rückgang von Inosit und Galaktinol verbunden.

Diese Ergebnisse sind zwar lediglich qualitativer Natur, stimmen aber gut mit den quantitativen Untersuchungen von Tanner, Seifarth und Kandler (60) an reifenden Samen von Phaseolus vulgaris überein. Sie weisen einerseits auf den Charakter der Raffinosezucker als Reservekohlenhydrate hin, zum anderen zeigen sie die intermediäre Rolle von myo-Inosit und Galaktinol.

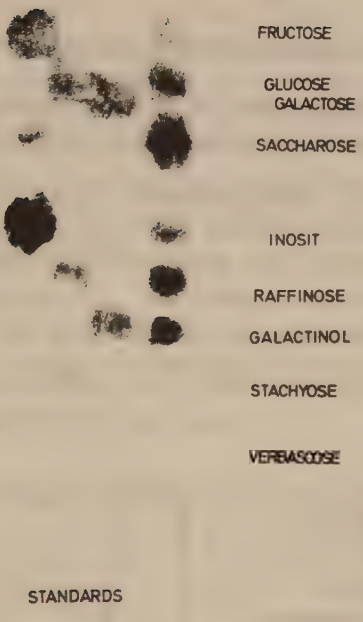


Abb. 4. Papierchromatographische Auftrennung eines Extraktes aus Weizenkeimlingen in Lösungsmittel C

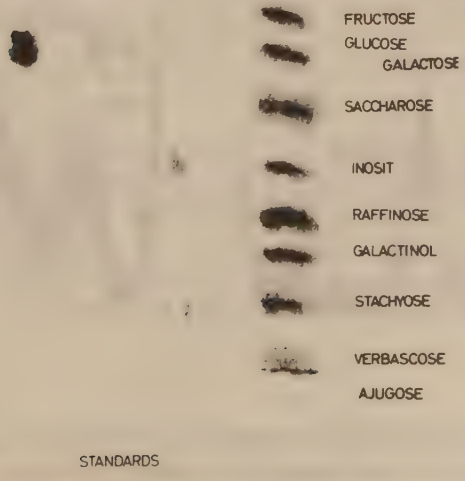


Abb. 5. Papierchromatographische Auftrennung eines Extraktes aus Samen von Vicia faba in Lösungsmittel C.

2. Die Biosynthese der Raffinose in vitro

2.1. Bildung von Raffinose in Rohextrakten aus Weizenkeimlingen und Samen von Vicia faba.

Zum Auffinden eines übertragenden Enzyms wurde ein zellfreier, dialysierter Extrakt aus Weizenkeimlingen mit markiertem Galaktinol als Donator und radioaktiver Saccharose als Acceptor inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden papierchromatographisch getrennt und die radioaktiven Substanzen mit einem Streifenzähler lokalisiert.

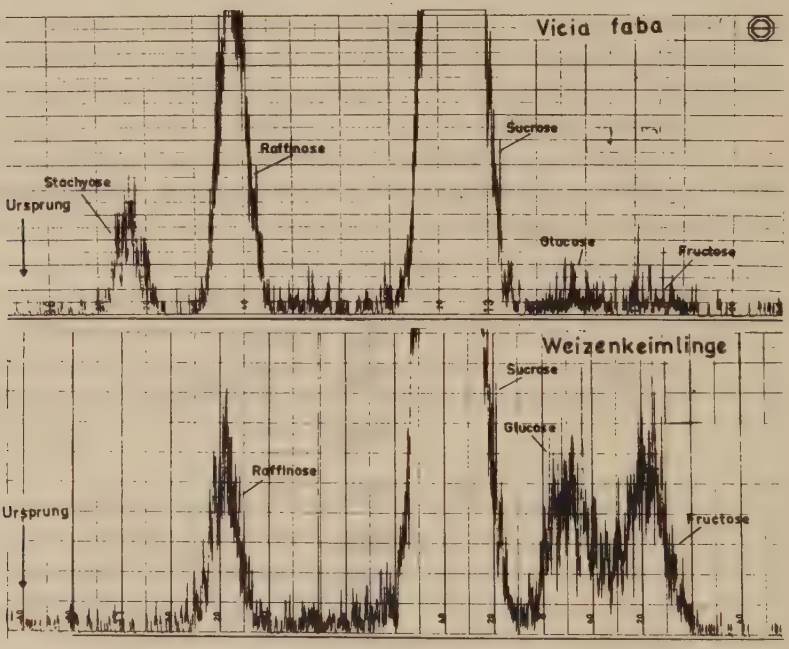


Abb. 6 . Galaktosylübertragung von Galaktinol auf ^{14}C-Saccharose mit Rohextrakten aus Samen von Vicia faba und Weizenkeimlingen.

Wie Abb. 6 und Tabelle 1 zeigen, konnte eine neue radioaktive Verbindung synthetisiert werden, welche papierchromatographisch mit Raffinose identisch war. In der Kontrolle, d.h. in Abwesenheit von Galaktinol wurde keine Raffinose gebildet. Jedoch konnte der Austausch von Galaktose zwischen Raffinose und Saccharose, der erstmals von Moreno und Cardini (40) beschrieben wurde, bestätigt werden.

Tabelle 1: Bildung von Raffinose in einem Rohextrakt aus Weizenkeimlingen

Reaktionstyp	Acceptor	Donator	Reaktionsprodukte (Ipm/mg)	
			Raffinose	Stachyose
Synthese	^{14}C-Saccharose	Galaktinol	1800	0
Austausch	^{14}C-Saccharose	Raffinose	8800	0
Kontrolle	^{14}C-Saccharose	-	0	0

Dialysierter Rohextrakt wurde mit den entsprechenden Substraten 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Außer 0.008 µMol ^{14}C-Saccharose (13 µCi/µMol) entsprachen die Bedingungen dem Normalansatz.

Auch ein Extrakt aus reifen Vicia faba-Samen vermag die Synthese- und Austauschreaktion zu katalysieren (Abb. 6 und Tabelle 2). Im Vergleich zu den Weizenkeimlingen ist das Verhältnis von Synthese- zu Austauschreaktion bei Vicia faba jedoch zu Gunsten der Synthese verschoben.

Darüber hinaus sei auf die Fähigkeit des Vicia faba-Extraktes im Gegensatz zu dem aus Weizenkeimlingen, Stachyose zu bilden, hingewiesen (Abb. 6). Dieses unterschiedliche Verhalten stimmt mit dem tatsächlichen Zuckergehalt der beiden Objekte überein. Die Stachyose muß hierbei aus bereits neu synthetisierter Raffinose durch Anhängung eines weiteren Galaktoserestes entstanden sein. (Falls nicht anders vermerkt, wird daher jeweils die Summe der Radioaktivität aus Raffinose und Stachyose als Maß für die enzymatische Aktivität verwendet).

Wenn UDP-Galaktose als Galaktosyldonator in den Test eingesetzt wurde, entstand mit dem Rohextrakt aus Vicia faba weder Raffinose noch Stachyose. Dagegen katalysierte er die Übertragung der Galaktose von UDP-Galaktose auf myo-Inosit. Diese Reaktion, bei der Galaktinol entsteht, war mit Extrakten aus Erbsen von Frydman und Neufeld (18) entdeckt worden.

Sowohl in den Präparationen aus Weizenkeimlingen als auch aus Vicia faba-Samen war die Produktbildung bei der Synthese- und bei der Austauschreaktion linear abhängig von der Inkubationszeit und der eingesetzten Eiweißmenge. In Abbildung 7 ist dies für den Rohextrakt aus Vicia faba dargestellt.

Tabelle 2: Bildung von Raffinose und Galaktinol in einem Rohextrakt aus Samen von Vicia faba

Reaktionstyp	Acceptor	Donator	Reaktionsprodukte (Ipm/mg)		
			Raffinose	Stachyose	Galaktinol
Synthese	^{14}C-Saccharose	Galaktinol	13200	2300	-
Austausch	^{14}C-Saccharose	Raffinose	19500	0	-
Kontrolle	^{14}C-Saccharose	-	0	0	-
Synthese	^{14}C-Saccharose	UDP-Gal	0	0	-
Synthese von Galaktinol	^{14}C-Inosit	UDP-Gal	-	-	24000
Kontrolle	^{14}C-Inosit	-	-	-	0

4.2 mg Protein wurden 4 Stunden bei 32°C unter Bedingungen von Test I inkubiert. Für die Synthese von Galaktinol enthielt das Reaktionsgemisch in einem Endvolumen von 50 µl: 0.5 µMol UDP-Galaktose, 0.13 µCi ^{14}C-myo-Inosit (160 µCi/µMol), 5 µMol Tris-HCl-Puffer, pH 7.2,und 4.2 mg Protein. Nach 4 Stunden bei 32°C wurden die Reaktionsprodukte durch Papierchromatographie in Lösungsmittel C getrennt.

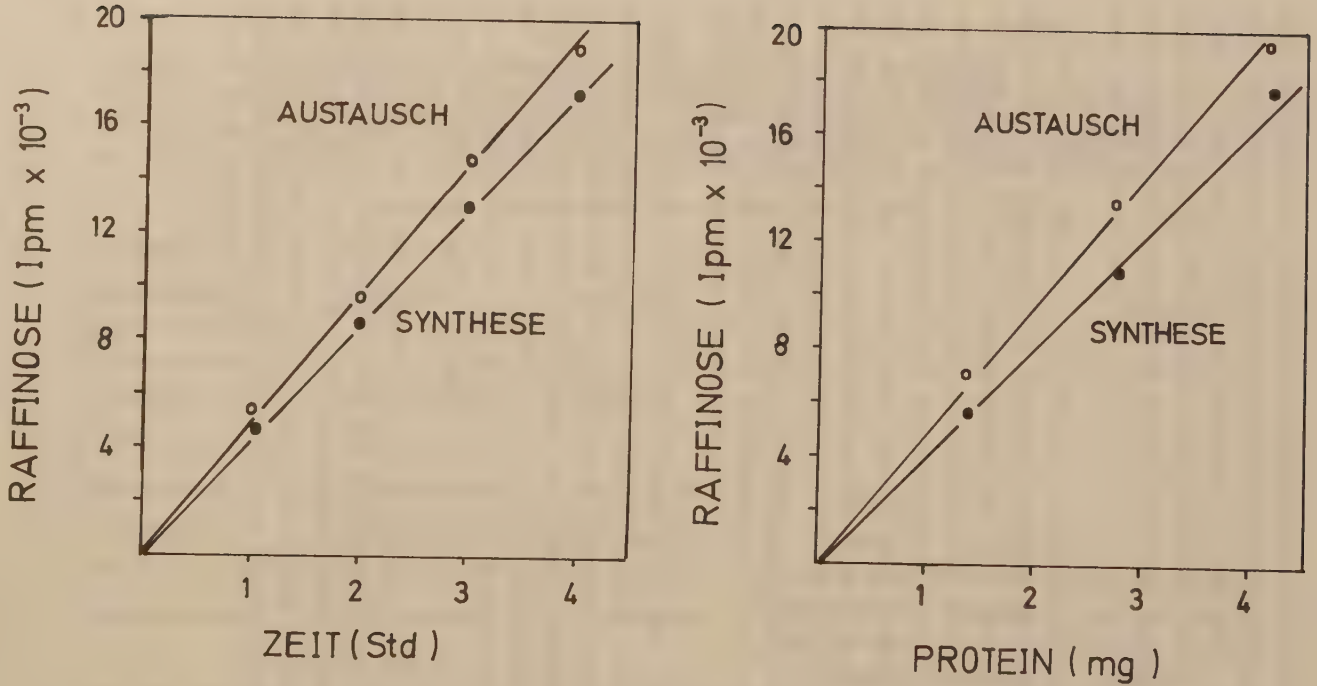


Abb 7. Abhängigkeit der Synthese- und Austauschrate von der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge.

2.2. Identifizierung der Reaktionsprodukte.

Die in den Reaktionen entstandene Raffinose wurde eluiert und in den Lösungsmittelsystemen A, C und E eindimensional sowie in den Lösungsmittelkombinationen A+E und A+D zweidimensional mit authentischer Raffinose cochromatographiert. In allen Fällen war eine Übereinstimmung festzustellen. Identität des Flecks auf dem Pherogrammpapier mit dem auf dem Autoradiogramm ergab sich auch bei Coelektrophorese in komplexierendem Boratpuffer.
Wurde die in Test I erhaltene ^{14}C-Raffinose mit α-Galaktosidase enzymatisch gespalten, so erhielt man als einzige radioaktive Verbindung ^{14}C-Saccharose, während mit ß-Galaktosidase keine Freisetzung von ^{14}C-Saccharose zu beobachten war. Bei Inkubation mit ß-Fructofuranosidase (Invertase) wurde radioaktive Melibiose und Fructose erhalten.
Die Identifizierung von Stachyose wurde in der bei Tanner und Kandler (57) beschriebenen Weise durchgeführt.

3. Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase

Die bisher angeführten Ergebnisse zeigen, daß aus Weizenkeimlingen und Samen von Vicia faba gewonnene Enzympräparationen die Übertragung des Galaktoserestes von Galaktinol auf Saccharose katalysieren. Eine genauere Charakterisierung läßt sich jedoch nur durch eine entsprechende Anreicherung erbringen. Sinn und Zweck der Reinigung war jedoch nicht nur eine möglichst saubere Proteinfraktion zu erhalten, sondern gleichzeitig auch noch weitere Fragestellungen zu beantworten.

Beispielsweise sollte durch Vergleich von Raffinose-synthese-, Austausch- und Stachyosesyntheseaktivität mit den jeweiligen Anreicherungsfraktionen Aufschluß darüber erhalten werden, ob nur ein oder etwa mehrere Enzyme für die genannten Reaktionen verantwortlich sind.
Ferner hatten Untersuchungen ergeben, daß Rohextrakte aus beiden Versuchsobjekten auch die Fähigkeit besitzen, p-Nitrophenyl-α-Galaktose zu hydrolysieren. Dieses ist ein typisches Substrat für eine α-Galaktosidase (14, 35, 43). Es wäre daher interessant zu erfahren, ob die Synthese von Raffinose ebenfalls von diesem, relativ unspezifischen Enzym katalysiert wird oder von einem anderen. Eine Trennung der beiden Aktivitäten während der Anreicherung könnte diese Frage klären.

Als Enzymquelle dienten reife Vicia faba-Samen. Wie die ersten Versuche nämlich gezeigt hatten, erwiesen sich die hieraus gewonnenen Präparationen im Vergleich zu den Weizenkeimlingen nicht nur als stabiler, sondern erlaubten, wie bereits erwähnt, auch einen Vergleich mit den am selben Objekt gewonnenen Ergebnissen über die Biosynthese von Stachyose und Verbascose.

Tabelle 3 gibt die Daten einer typischen Reinigung, ausgehend von 200 g reifen Samen wieder. Die optimalen Bedingungen jedes einzelnen Reinigungsschrittes, im Hinblick auf die Synthesereaktion wurden in zahlreichen Vorversuchen ermittelt und sind unter Material und Methoden genau beschrieben.

In Abb. 8 ist das Eluationsprofil einer DEAE-Cellulosesäule mit einem KCl-Gradienten von 0.05 M bis 0.2 M dargestel

Das Protein wurde bei 280 mμ gemessen und auf einen Schreiber mit doppelter Skalenexpansion übertragen. Die Enzymaktivität erscheint für Synthese und Austausch bei einer Molarität von etwa 0.1 M.

Den in der Regel als letzten durchgeführten Reinigungsschritt (vgl. hierzu III.5) zeigt Abb. 9. Es war dies eine Gelchromatographie an Sephadex G-200.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, verlaufen Synthese- und Austauschreaktion während sämtlicher Reinigungsschritte so gut wie parallel. Dies kann man als Hinweis dafür werten, daß beide Reaktionen, was später noch näher diskutiert wird, vom gleichen Enzym katalysiert werden. Auch die in der Regel identische und symmetrische Aktivitätsverteilung von Synthese und Austausch in der Abb. 9 mag dies unterstreichen.

Im Unterschied dazu ging die Fähigkeit des Rohextraktes p-Nitrophenyl-α-Galaktose zu hydrolysieren im Verlauf der Anreicherung rasch verloren und läßt sich sogar völlig abtrennen. Bereits der erste Fällungsschritt mit Protaminsulfat erwies sich hierfür als sehr vorteilhaft. Die Abtrennung der α-Galaktosidase dürfte auch die Ursache für die scheinbare Erhöhung der Gesamtaktivität von Synthese- und Austauschreaktion bei der Protaminsulfatfraktion gegenüber dem Rohextrakt sein. (Raffinose ist ein gutes Substrat für α-Galaktosidasen).

Die Fähigkeit der Fraktionen zur Stachyosesynthese deckt sich anfangs vollkommen mit derjenigen zur Raffinosesynthese, geht jedoch im Verlauf der Anreicherung völlig verloren.

Tabelle 5: Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase

Fraktion	Protein	Raffinosesynthese		
	mg	Ges.Akt. $\frac{Ipmx10^{-6}}{h}$	%	Spez.Akt. $\frac{Ipmx10^{-3}}{hxmg}$
1. Rohextrakt	22000	85,2	(100)	3.8
2. Protaminsulfat	9350	94,6	(110)	10.2
3. Ammoniumsulfat	2688	75,6	(88)	28.1
4. DEAE-Cellulose	182	30,2	(35)	165.8
5. Sephadex G-200	50	14,2	(17)	285.0

Ges. Akt. = Gesamtaktivität
Spez. Akt. = Spezifische Aktivität

Austauschreaktion			Stachyosesynthese			α-Galaktosidase-aktivität		
Ges.Akt. $\frac{Ipmx10^{-6}}{h}$	%	Spez.Akt. $\frac{Ipmx10^{-3}}{hxmg}$	Ges.Akt. $\frac{Ipmx10^{-6}}{h}$	%	Spez.Akt. $\frac{Ipmx10^{-3}}{hxmg}$	Ges.Akt. $\frac{\mu Molx10^{-2}}{h}$	%	Spez.Akt. $\frac{m\mu Mol}{hxmg}$
107.0	(100)	4.9	23.1	(100)	1.1	15.4	(100)	70
112.0	(105)	12.0	24.8	(107)	2.7	2.7	(18)	29
93.7	(88)	35.0	16.0	(70)	6.0	1.6	(10)	58
33.2	(31)	182.5	0		0	0.05	(0.3)	29
19.4	(18)	387.5	0		0	0	0	0

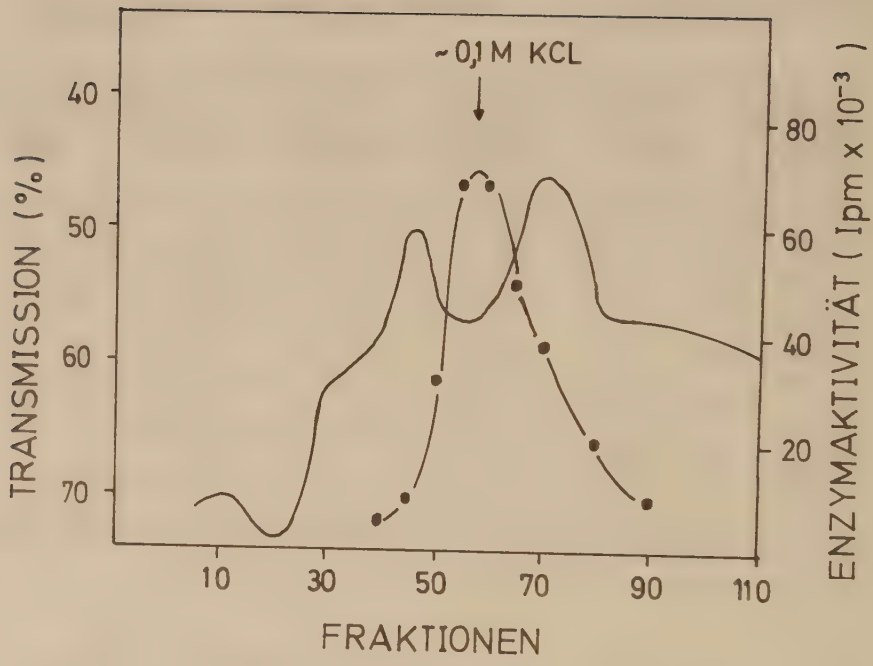


Abb. 8. Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase durch DEAE-Cellulose-Chromatographie.

●——● Syntheseaktivität

——— Proteinverteilung

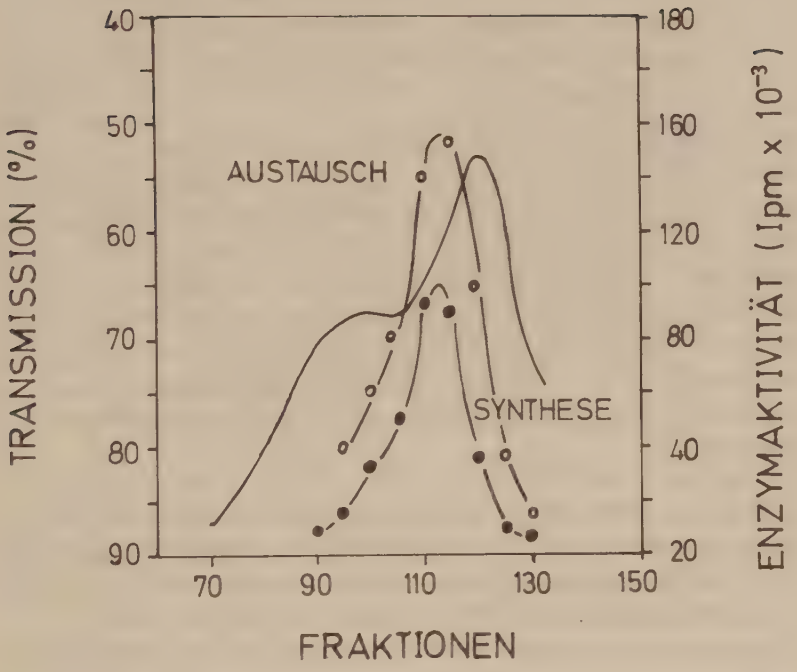


Abb. 9. Reinigung der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase durch Sephadex G-200 Chromatographie

●——● Syntheseaktivität

○——○ Austauschaktivität

——— Proteinverteilung

Zwei Interpretationen waren denkbar:

1. Die Synthese beider Oligosaccharide wird von verschiedenen Enzymen katalysiert.
2. "Raffinose- und Stachyoseenzym" sind identisch, der katalytische Ort der Stachyosesynthese wird aber während der Fraktionierung so verändert, daß diese Reaktion nicht mehr ablaufen kann.

Auf Grund der bisherigen Kenntnisse dürfte die erste Möglichkeit zutreffen. Wie sich nämlich gezeigt hat, ist das Raffinose synthetisierende Enzym sehr labil (vgl. III.4.6.), so daß eher das Gegenteil der in Punkt 2 gemachten Annahme zu erwarten wäre. Ein ausreichender biochemischer Beweis für die Existenz zweier Enzyme wäre allerdings erst durch einen positiven Nachweis der Stachyosesynthese in anderen Fraktionen als in denen der Raffinosesynthese erbracht.
In der Regel konnte mit der beschriebenen Anreicherungsmethode eine 70-fache, in den besten Fällen sogar eine 100-fache Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber dem Rohextrakt erzielt werden. Das auf diese Weise gewonnene Enzym wurde für die meisten der folgenden Untersuchungen verwendet. Weitere Anreicherungsversuche mit einer Chromatographie auf Hydroxyapatit und deren Problematik sind unter III.5 beschrieben.

4. Eigenschaften der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase

Das Studium der Anreicherung hat erkennen lassen, daß in den Samen ein Galaktose übertragendes Enzym vorhanden ist. Dieses ist von einer α-Galaktosidase verschieden und katalysiert neben der Synthese von Raffinose möglicherweise auch die beobachtete Austauschreaktion.

Weitere Hinweise hierzu sollten sich ferner aus einer näheren Charakterisierung des gereinigten Enzyms ergeben.

4.1. Acceptor- und Donatorspezifität

Die Acceptor- und Donatorspezifität wurde mit einem 100-fach angereicherten Extrakt aus Vicia faba getestet (Tabelle 4). Es zeigte sich, daß das Enzym eine hohe Spezifität besitzt. Auf folgende mögliche Acceptoren wurde beispielsweise keine Übertragung des Galaktosylrestes von ^{14}C-Galaktinol beobachtet: Raffinose, Stachyose, Fructose, Glucose, Galaktose, Lactose, Cellobiose, Melibiose, Glycerin. Ausschließlich Saccharose diente als Acceptor. Das gereinigte Enzym vermag somit nicht die Synthese der nächst höheren homologen Zucker Stachyose und Verbascose zu katalysieren. Beide enzymatische Aktivitäten wurden in Vicia faba wie bereits erwähnt nachgewiesen (59).

Es soll an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, daß während der Inkubation mit Saccharose freie ^{14}C-Galaktose auf Grund einer Hydrolyse von ^{14}C-Galaktinol entstand; jedoch war bei der gleichen Inkubation die übertragene Menge Galaktose fast 5-fach größer als die gespaltene. In der Abwesenheit eines Acceptors wurde dagegen beträchtlich mehr Galaktose freigesetzt, erreichte aber nie die Menge, die auf Saccharose übertragen wurde. Auf Grund dieser Korrelation von Transfer und Hydrolyse, sowie der Tatsache, daß die Präparation keine α-Galaktosidaseaktivität mehr zeigt (keine Spaltung von PNPG), müßte die Hydrolyse ausschließlich von dem Raffinose synthetisierenden Enzym katalysiert werden und Saccharose mit Wasser als Acceptor konkurrieren.

Tabelle 4: Acceptor- und Donatorspezifität eines 100-fach angereicherten Extraktes aus Vicia faba.

Donator	Acceptor	Reaktionsprodukte (Ipm)	
		Raffinose	Galaktinol
^{14}C-Galaktinol	Saccharose	11500	2500
^{14}C-Galaktinol	H_2O	0	10000
	Raffinose, Stachyose, Fructose, Glucose, Galaktose, Lactose, Cellobiose, Melibiose, Glycerin	keine Acceptoren	
Galaktinol	^{14}C-Saccharose	24000	
UDP-Galaktose	^{14}C-Saccharose	0	
α-PNPG	^{14}C-Saccharose	13200	
Raffinose	^{14}C-Saccharose	33400	
Stachyose	^{14}C-Saccharose	1000	
Melibiose	^{14}C-Saccharose	1000	

In dem Acceptorexperiment bestand das Reaktionsgemisch aus 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2, 0.5 µMol Acceptor, 150000 Ipm ^{14}C-Galaktinol und 0.15 mg Protein in einem Endvolumen von 50 µl. Nach 4 Stunden bei 32° C wurde die Reaktion beendet.
Im Falle der Donatorspezifität enthielt das Reaktionsgemisch 0.5 µMol Donator, 0.02 µMol ^{14}C-Saccharose (35 µCi/µMol), 5 µMol Tris-HCl und 0.1 mg Protein. Die Inkubationszeit betrug 2.5 Std. bei 32° C.

Tabelle 5: Raffinosesynthese mit einem dialysierten Rohextrakt und einem 4-fach angereicherten Extrakt aus Weizenkeimlingen.

Fraktion	Reaktionstyp	Acceptor	Donator	Reaktionsprodukte (lpm/mg) Raffinose	Galaktose
Rohextrakt	Synthese	Saccharose	^{14}C-Galaktinol	230	220
	Kontrolle	H_2O	"	0	340
Angereicherter Extrakt	Synthese	Saccharose	^{14}C-Galaktinol	940	600
	Kontrolle	H_2O	"	0	1200

Der Testansatz enthielt 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2, 0.5 µMol Saccharose und 0.013 µMol ^{14}C-Galaktinol (7 µCi/µMol). Die Inkubationszeit betrug 4 h bei 32°C.

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf das übertragende und spaltende Verhalten, allerdings weniger ausgeprägt, wurden auch mit dem Enzym aus Weizenkeimlingen erhalten (Tabelle 5). Die Übertragung liegt in einem Rohextrakt in der gleichen Größenordnung wie die Hydrolyse; das Verhalten verschiebt sich jedoch nach 4-facher Anreicherung, während der ein Teil der α-Galaktosidaseaktivität abgetrennt wird, zu Gunsten der ersteren. In jedem Fall war die Spaltung in der Kontrolle, d.h. in Abwesenheit von Saccharose, größer als bei deren Anwesenheit.

Unter den getesteten Donatoren (Tabelle 4) war lediglich mit Galaktinol, p-Nitrophenyl-α-Galaktose und Raffinose eine Übertragung in signifikanter Weise zu beobachten. Die letzt genannte Reaktion entspricht der Austauschreaktion zwischen Raffinose und Saccharose. UDP-Galaktose erwies sich erneut wie im Rohextrakt als kein Galaktosyldonator für die Biosynthese von Raffinose.

Das Enzym weist somit eine hohe Spezifität auf. Im Vergleich dazu übertragen α-Galaktosidasen von einer bzw. auf eine Vielzahl von Substraten: sie sind also relativ unspezifisch (8, 12, 65).

4.2. Enzymkinetik

K_m-Werte wurden für Galaktinol, Saccharose und Raffinose mit dem ^{14}C-Saccharosetest bestimmt (siehe Abb. 10 und Tabelle 6). Es zeigte sich, daß die Reaktionen klassischer Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Der K_m-Wert für Galaktinol wurde als 7×10^{-3} M bei pH 7.2 und 52°C in Gegenwart von 0.4 mM Saccharose bestimmt. Für Raffinose ist er 1×10^{-2} M, wenn 0.2 mM Saccharose anwesend sind. Die Michaeliskonstante betrug für Saccharose in der Synthesereaktion 1×10^{-3} M und in der Austauschreaktion 2.9×10^{-3} M in Gegenwart von 0.02 M Galaktinol (Synthese)

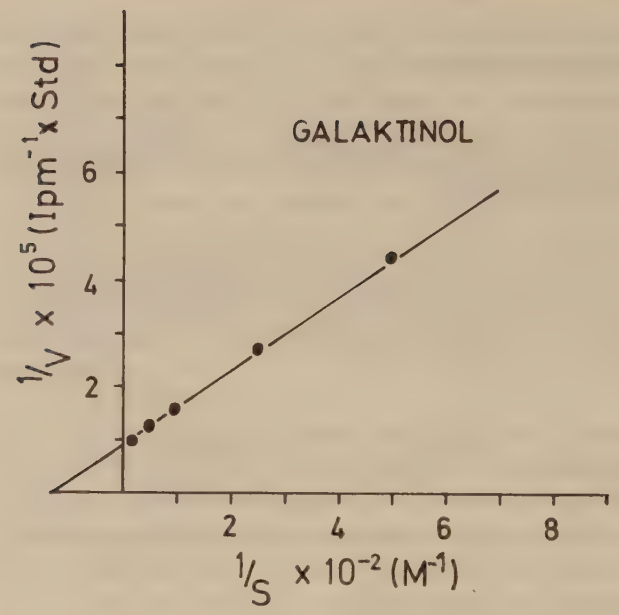
bzw. Raffinose (Austausch).

Tabelle 6: K_m-Werte der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase

Substrat	Synthesereaktion	Austauschreaktion
Galaktinol	7.0×10^{-3}	-
Raffinose	-	1.0×10^{-2}
Saccharose[1)]	1.0×10^{-3}	2.9×10^{-3}
Saccharose[2)]	1.4×10^{-3}	4.7×10^{-4}

1) in Gegenwart von 0.02 M Donor
2) in Gegenwart von 0.0002 M Donor
d.h. Galaktinol für die Synthesereaktion und Raffinose für die Austauschreaktion

Wurde jedoch die Galaktinol- oder Raffinosekonzentration auf 2×10^{-4} M erniedrigt, so blieb der K_m-Wert für Saccharose in der Synthesereaktion gleich (1.4×10^{-3} M), in der Austauschreaktion war er jedoch beträchtlich niedriger (4.7×10^{-4} M). Dies könnte auf folgende Weise interpretiert werden. Die Enzymheftungsstelle für Raffinose und Saccharose ist identisch; eine hohe Raffinosekonzentration wirkt sich wie ein kompetitiver Hemmstoff aus.
Demgegenüber scheint der Bindungsort von Galaktinol und Saccharose verschieden zu sein. Eine Konzentrationsänderung eines der Reaktionspartner hat keinen Einfluß auf die Michaeliskonstante des anderen.



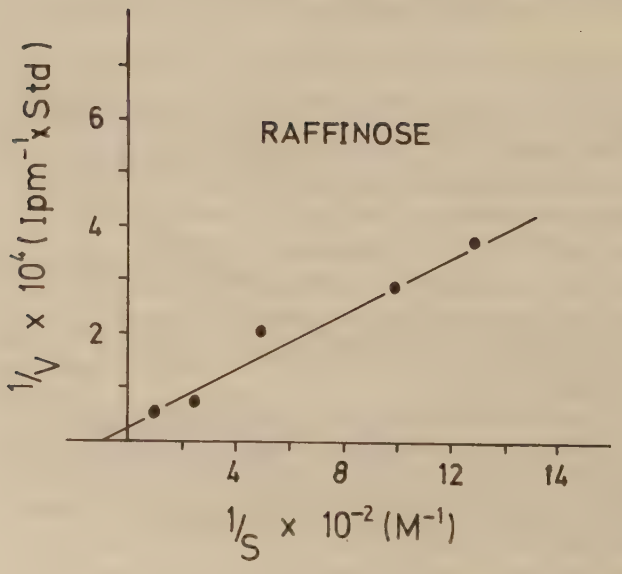


Abb. 10. Lineweaver-Burk Darstellungen zur Bestimmung der Michaeliskonstanten von Galaktinol und Raffinose.

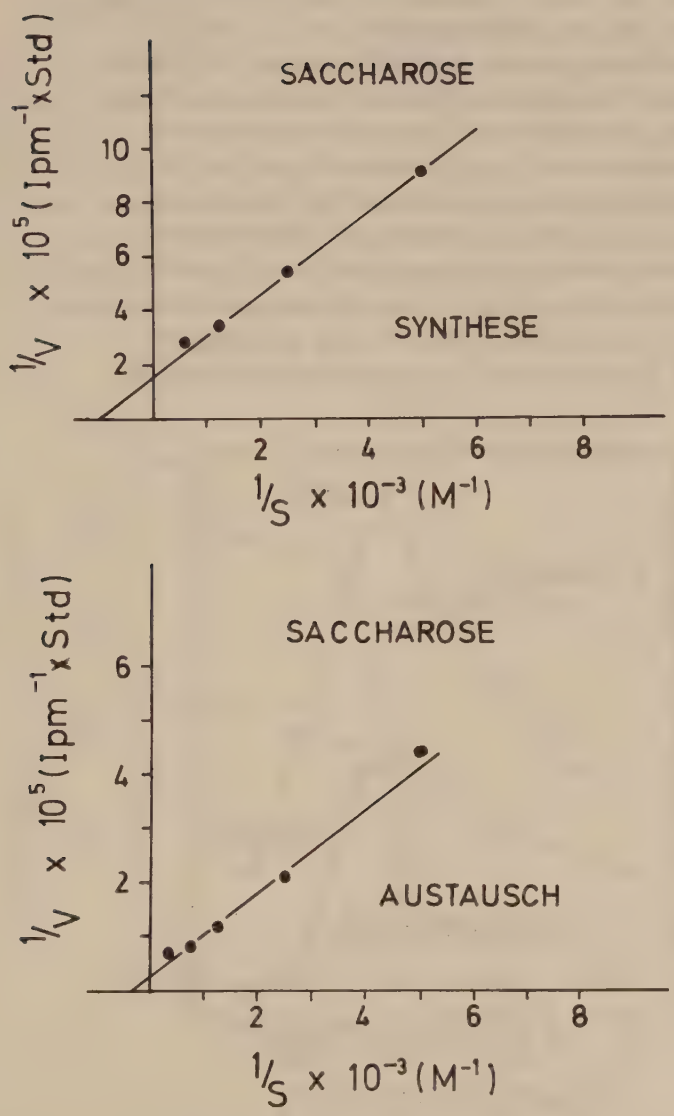


Abb. 10. Lineweaver-Burk Darstellungen zur Bestimmung der Michaeliskonstanten von Saccharose in Gegenwart von 0.02 M Donator (Galaktinol in der Synthesereaktion und Raffinose in der Austauschreaktion).

4.3. Temperaturabhängigkeit von Synthese- und Austauschreaktion.

Das Optimum, bei dem die maximale Umsatzrate erfolgt, liegt sowohl für die Synthesereaktion als auch für die Austauschreaktion bei etwa 42°C (Abb. 11). Oberhalb 44° nimmt die Geschwindigkeit in beiden Fällen stark ab. Die Ursachen hierfür können theoretisch ziemlich komplex sein (z.B. können Effekte auf die Stabilität des Enzyms, auf den Zerfall des Enzym-substratkomplexes, auf die Enzymsubstrataffinität u.a. diskutiert werden), lassen sich aber relativ leicht experimentell analysieren. In unserem Fall handelt es sich um eine Inaktivierung des Enzyms bei höheren Temperaturen, wie der folgende Versuch zeigte.

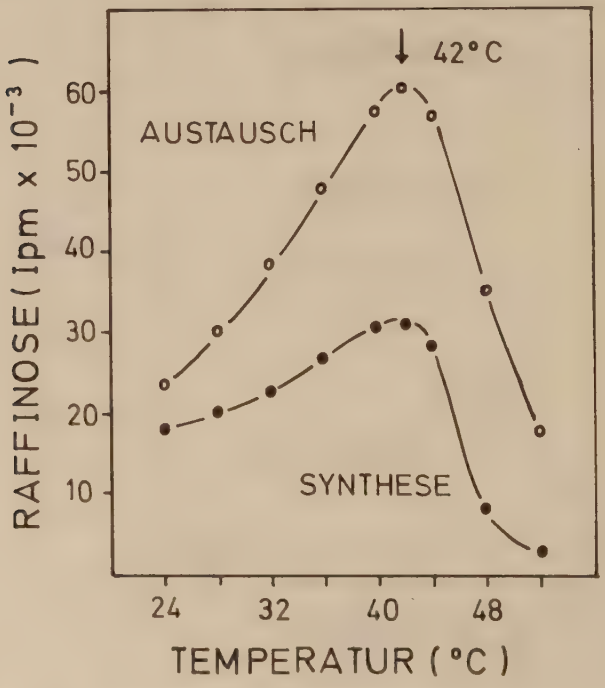


Abb. 11 . Temperaturabhängigkeit der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase an Hand von Synthese- und Austauschreaktion.
Es wurde 0.14 mg Protein in den Test eingesetzt und 1 Std. bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

4.4. Stabilität der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase.

Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß das Enzym unter den gegebenen Bedingungen bis etwa 44°C in seiner katalytischen Aktivität stabil bleibt. Bei höheren Temperaturen tritt in beiden Reaktionen, wobei die Synthesereaktion etwas empfindlicher ist, ein Aktivitätsverlust auf, der mit dem rechten Ast der Temperaturoptimumskurve korreliert. Das Verhältnis von Synthese- zu Austauschaktivität verschiebt sich von 0.62 (40°C) auf 0.42 (50°C).

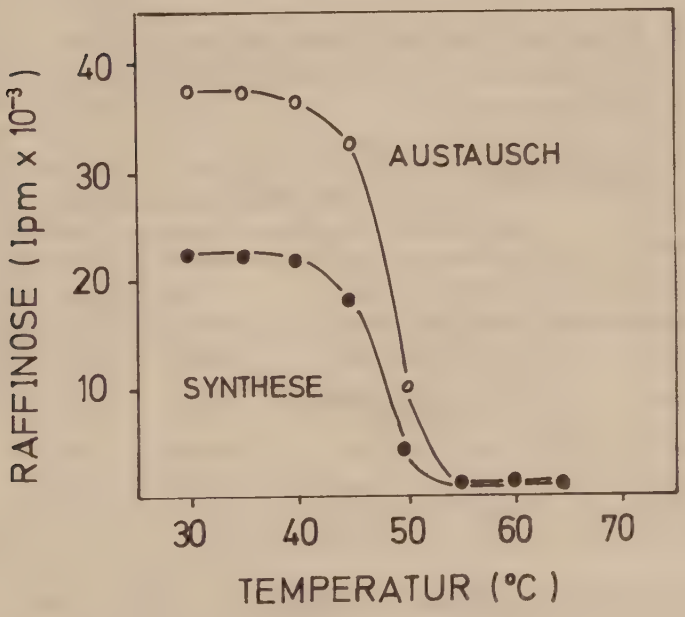


Abb. 12 . Hitzestabilität der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase.

0.14 mg Protein wurden 10 Min. bei der entsprechenden Temperatur ohne Substrate vorinkubiert und anschließend 1 Std. unter Standardbedingungen getestet.

Im Zusammenhang mit Inaktivierungsversuchen ist auch die Frage interessant, ob und in welchem Maße Substrate auf das Enzym stabilisierend wirken können. Es wurde daher eine definierte Menge Enzym mit und ohne die einzelnen Substrate bei 50°C 10 Min. vorinkubiert. Die Menge entsprach den üblichen Testbedingungen. Nach Beendigung der Vorinkubation wurde unter Eiskühlung jeweils der Rest des Inkubationsgemisches hinzugegeben, und der Test unter Standardbedingungen ausgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Vorinkubation. Es zeigte sich, daß vor allem Galaktinol und Raffinose das Enzym vor Hitzeinaktivierung schützen und zwar jeweils um den gleichen Faktor.

Tabelle 7: Hitzestabilität der Galaktinol-Saccharose-6-Galaktosyltransferase in Abhängigkeit der Substrate

Substrat	Aktivität nach Vorinkubation			
	Synthesereaktion		Austauschreaktion	
	Ipm	%	Ipm	%
Kontrolle	22750	100	46250	100
-Substrat	4350	19	16600	36
+Donator	7500	33	29600	64
+Acceptor	4500	20	18000	38

0.14 mg Sephadexenzym wurde 10 Minuten bei 50°C mit oder ohne Substrat vorinkubiert. Dann wurde der Rest des Inkubationsgemisches hinzugegeben und 2 Std. 30 Min. unter Standardbedingungen getestet.

Saccharose hat, jedenfalls bei der hier verwendeten Konzentration, keinen Einfluß (Tabelle 7). Die Ursache der Inaktivierung kann eine irreversible Denaturierung, möglicherweise aber auch nur ein reversibler Zerfall des Enzyms bei höheren Temperaturen sein.

In Abb. 13 ist die Stabilität des Enzyms (Rohextrakt) bei 4°C über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt.

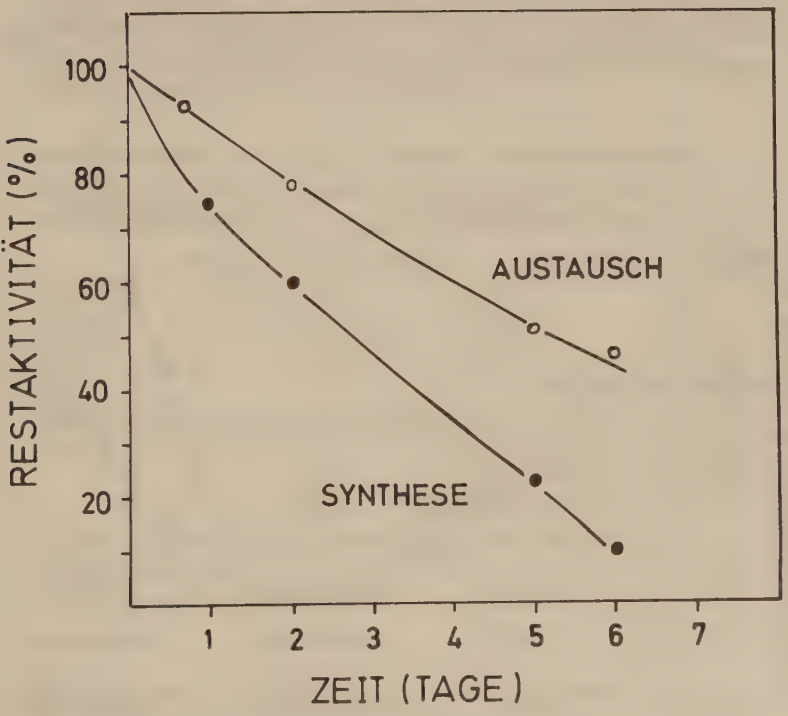


Abb. 13 . Stabilität der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase bei 4°C.

Auch hier kommt wieder die etwas größere Labilität der Synthesereaktion gegenüber der Austauschreaktion zum Ausdruck. Die Aktivität des gereinigten Enzyms im eingefrorenen Zustand bleibt jedoch für mindestens einen Monat erhalten.

4.5. pH-Abhängigkeit von Synthese- und Austauschreaktion.

Das gereinigte Enzym wie auch der Rohextrakt haben ihren optimalen Wirkungsbereich für die Synthesereaktion bei pH 7.0 und für die Austauschreaktion bei pH 7.3 . In Abb. 14 ist dies für das gereinigte Enzym graphisch dargestellt. Kaliumphosphatpuffer bewirkt gegenüber Tris-HCl-Puffer eine Stimulierung.

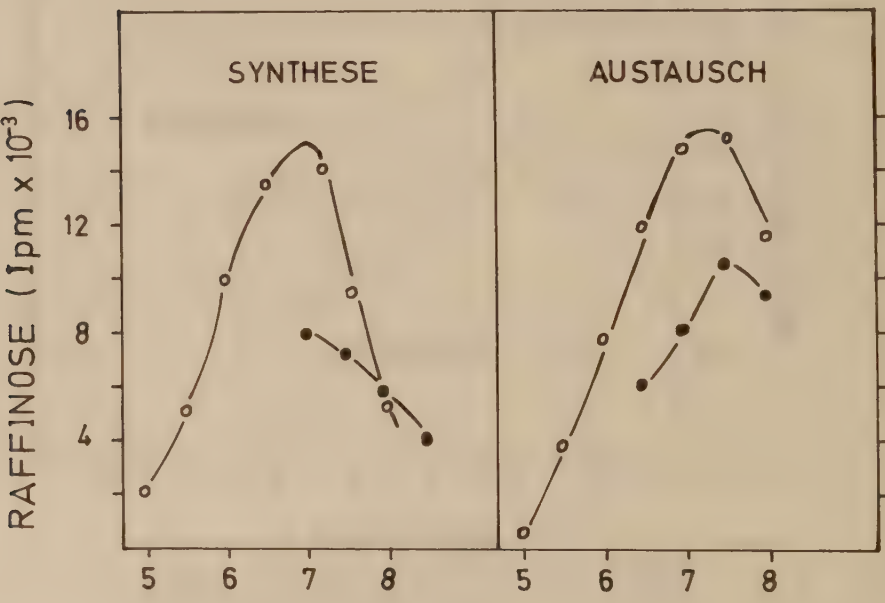


Abb. 14. pH-Abhängigkeit der Synthese- und Austauschreaktion

o—o Kaliumphosphatpuffer

● ● Tris-HCl-Puffer

4.6. Einfluß von SH-Schutzmitteln auf Raffinosesynthese, Austauschreaktion und Stachyosesynthese

Als ein entscheidendes Kriterium für das Auffinden des Enzyms der Raffinose-Synthesereaktion hat sich deren hohe Abhängigkeit von Sulfhydrylschutzmitteln erwiesen. Am weitaus besten eignete sich Clelands Reagenz; ein Unterschied zwischen der Erythritform (DTE) und der Threitform (DTT) war nicht festzustellen. Mit Mercaptoäthanol in einer 10-fach höheren Konzentration konnten zwar 80% der im Vergleich zu Clelands Reagenz beobachteten Aktivität erzielt werden, ein Einfrieren ohne größeren bis völligen Aktivitätsverlust war jedoch nicht möglich.

Tabelle 8: Einfluß von Clelands Reagenz (DTE) auf Raffinosesynthese, Austauschreaktion und Stachyosesynthese mit einem Rohextrakt aus Vicia faba.

Reaktionstyp	Reaktionsprodukte	Extraktbehandlung	
		Extraktion + Dialyse mit DTE	Extraktion + Dialyse ohne DTE
	Ipm		
Raffinose-synthese	Raffinose	2100	0
Austausch	Raffinose	2600	1500
Stachyose-synthese	Stachyose	4500	3700

2.8 mg Protein wurden entsprechend Test I und III inkubiert; die Menge an Saccharose betrug jedoch 0.08 µMol (1.6 µCi/µMol). Für die Stachyosesynthese enthielt das Reaktionsgemisch in einem Endvolumen von 50 µl: 0.5 µMol Raffinose, 0.013 µMol ^{14}C-Galaktinol (7 µCi/µMol), 5 µMol Tris-HCl, pH 7.2 und Prote

In Tabelle 8 wird der unterschiedliche Einfluß von DTE während der Isolierung auf die Raffinosesynthese, Austauschreaktion und Stachyosesynthese gezeigt. Erfolgte die Extraktion und Dialyse ohne Clelands Reagenz, konnte bei der Synthesereaktion keine Radioaktivität in Raffinose gefunden werden, diejenige der Austauschreaktion war um 40% geringer. Demgegenüber war auf die Stachyosesynthese kaum ein Einfluß festzustellen.

Das verschiedene Verhalten von Synthese- und Austauschreaktion gegenüber dem SH-Schutzmittel braucht nicht für die Existenz zweier Enzyme zu sprechen und könnte durch die folgende Annahme erklärt werden:
Analog zu Übertragungsreaktionen, bei denen die Konfiguration am anomeren Kohlenstoff des Produkts die gleiche ist wie im Glycosyldonator (19, 41) kann auch hier ein kovalent gebundener Galaktose-Enzymkomplex angenommen werden. Dieser vermag in einem zweiten Reaktionsschritt dann weiter zu reagieren.
Für die Synthesereaktion würde dann gelten:

(1) Galaktinol + Enzym $\rightleftharpoons$ Enzym-Galaktose + myo-Inosit
(2) Enzym-Galaktose + Saccharose $\rightleftharpoons$ Raffinose + Enzym.

Für die Austauschreaktion ist jedoch nur Schritt 2 nötig. Es müßte daher gefordert und im einzelnen auch noch bewiesen werden, daß vor allem der erste Teilschritt das schützende Agens benötigt. Ein erster experimenteller Ansatzpunkt hierzu könnte die Messung der folgenden zu erwartenden Austauschreaktion in Abhängigkeit von SH-Schutzmitteln und SH-Gruppengiften sein:

Galaktinol + myo-^{14}C-Inosit $\rightleftharpoons$ ^{14}C-Galaktinol + myo-Inosit

In diesem Zusammenhang war auch die Frage interessant, ob etwa durch nachträgliche Zugabe von Clelands Reagenz eine Reaktivierung des Enzyms möglich sei. Es wurde daher ein Rohextrakt isoliert, der nur eine geringe Syntheserate zeigte (Extraktion mit $5x10^{-5}$M DTE, Dialyse ohne DTE). 30 Minuten Vorbehandlung des Enzyms bei 28°C mit DTE $5x10^{-3}$M Endkonzentration verursachte eine 4-fache Aktivitätssteigerung bei der Synthesereaktion und eine 2-fache bei der Austauschreaktion. Das sonst zu beobachtende Verhältnis von 0.8 für Synthese zu Austausch wurde aber nicht erreicht. Beide Reaktionen sind somit SH-empfindlich, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reaktivierung von Synthese- und Austauschreaktion durch Clelands Reagenz

	Synthese Ipm	Austausch Ipm
Rohextrakt	1700	5700
Reaktivierter Rohextrakt	6700	10000

Enzym wurde 30 Minuten mit $5x10^{-3}$M DTE bei 28°C inkubiert und anschließend im Normalansatz getestet. Die Inkubationszeit betrug 150 Minuten.

Ähnliche Reaktivierungsversuche mit Ammoniumsulfat- oder Sephadexextrakten, die infolge mehrmaligen Einfrierens Aktivitätsverluste aufwiesen, verliefen allerdings negativ. Offenbar erfolgt durch die bei der Eisbildung auftretenden Scheerkräfte eine irreversible Denaturierung des Enzyms.

4.7. Hemmung der enzymatischen Aktivität durch SH-Gifte und Schwermetallionen.

Die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität des Enzyms von SH-Gruppen sollte sich auch in deren Hemmung durch verschiedene SH-Gruppengifte zeigen. In Tabelle 10 kommt dies zum Ausdruck.

Tabelle 10: Hemmung der Synthese- und Austauschreaktion durch SH-Gruppen spezifische Reagenzien

Hemmstoff	Synthese Ipm	Hemmung %	Austausch Ipm	Hemmung %
Kontrolle	21500	0	35500	0
PCMB	850	96	2750	93
Iodacetamid	11000	49	31500	11
NAM	2150	90	26500	16

0.15 mg gereinigtes Enzym wurde mit dem Standardtestansatz unter Standardbedingungen 2 Stunden inkubiert. Die Inhibitorkonzentration betrug 10^{-3}M.

Die einzelnen SH-Gifte weisen dabei in ihrer Wirksamkeit ziemlich große Unterschiede auf. Während mit PCMB sich Synthese und Austausch in gleicher Weise hemmen lassen, haben Iodacetamid und N-Äthylmaleimid nicht nur eine insgesamt geringere Hemmwirkung, sondern zeigen auch erwartungsgemäß (vgl. 4.6.) einen unterschiedlichen Effekt auf die beiden genannten Reaktionen.

Möglicherweise könnte jedoch auch mit PCMB in geringerer Konzentration (PCMB ist eines der empfindlichsten SH-reagenzien überhaupt und besitzt in höheren Konzentrationen auch SH-Gruppenunspezifische Wirkungen auf Enzyme) ein ähnliches Verhalten gezeigt werden.

Es sei noch bemerkt, daß die verwendeten Konzentrationen an SH-Giften etwas hoch erscheinen; sie müssen aber in Zusammenhang mit der in den Extrakten vorhandenen Menge an Clelands Reagenz gesehen werden. Eine vorherige Abtrennung desselben, etwa über Sephadex G 25, kam wegen des zu großen Aktivitätsverlustes nicht in Betracht.

Tabelle 11: Einfluß von Metallionen auf Synthese- und Austauschaktivität

Metallion	Synthese Ipm	Hemmung %	Austausch Ipm	Hemmung %
Kontrolle	20200		31400	
Ag^{2+}	0	100	0	100
Hg^{2+}	0	100	0	100
Zn^{2+}	0	100	0	100
Al^{3+}	0	100	0	100
Mg^{2+}	21200	0	33000	0
Mn^{2+}	8400	59	20000	36

0.15 mg gereinigtes Enzym wurde mit dem Standardtestansatz unter Standardbedingungen 1.5 Stunden inkubiert. Die Metallionenkonzentration betrug 10^{-3}M.

Weiterhin unterstreicht die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Schwermetallionen eine mögliche —Schwermetallionen können auch mit Carboxylgruppen und Histidingruppen reagieren (15)— Beteiligung von SH-Gruppen bei der enzymatischen Katalyse (Tabelle 10). Unter den gegebenen Bedingungen tritt eine 100%ige Hemmung mit Al^{3+}, Ag^{+}, Hg^{2+} und Zn^{2+} für beide Reaktionen auf. Eine vielfach für eine gute enzymatische Aktivität zu beobachtende Notwendigkeit von Metallionen (nicht Schwermetallionen) konnte nicht festgestellt werden. Mg^{2+} hat keinen Einfluß, jedenfalls nicht in Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-4}M; Mn^{2+} zeigt eine Hemmwirkung.

4.8. Bestimmung des Molekulargewichtes der Transferase mit Sephadex Gel G-200 Chromatographie und Dichtegradientenzentrifugation.

Das ungefähre Molekulargewicht des Enzyms wurde zum einen durch Gelfiltration an Sephadex G-200 in 0.01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, mit 0.1 M KCl und 0.01 M DTE ermittelt. Es ist dies die Methode nach Andrews (1), welche auf der Ermittlung des Eluationsvolumens von Proteinen bekannten Molekulargewichtes beruht. Die Eichung der Sephadex-Säule ist in Abb. 15 dargestellt. Unter der Annahme, daß das Enzym eine ähnliche Molekülgestalt wie die der Markerproteine besitzt, wurde ein Molekulargewicht von 80000 ermittelt. Das Eluationsvolumen wurde sowohl an Hand der Synthese- als auch der Austauschreaktion bestimmt und war in beiden Fällen identisch.

Als eine weitere Methode für die Molekulargewichtsbestimmung wurde die Dichtegradientenzentrifugationstechnik nach Martin und Ames (26) herangezogen. Sie wurde jedoch dahingehend abgewandelt, daß anstelle eines Saccharosedichtegradienten ein Glycerindichte-

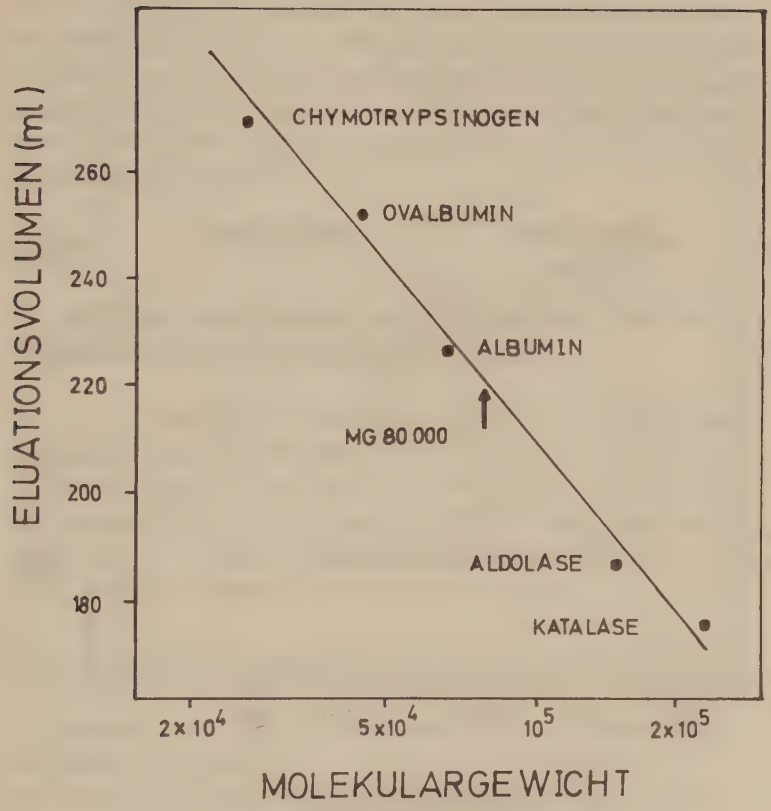


Abb. 15. Eichung der Sephadex G-200 Säule und Bestimmung des Molekulargewichtes der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase. Der Pfeil gibt die Position der Transferase an.

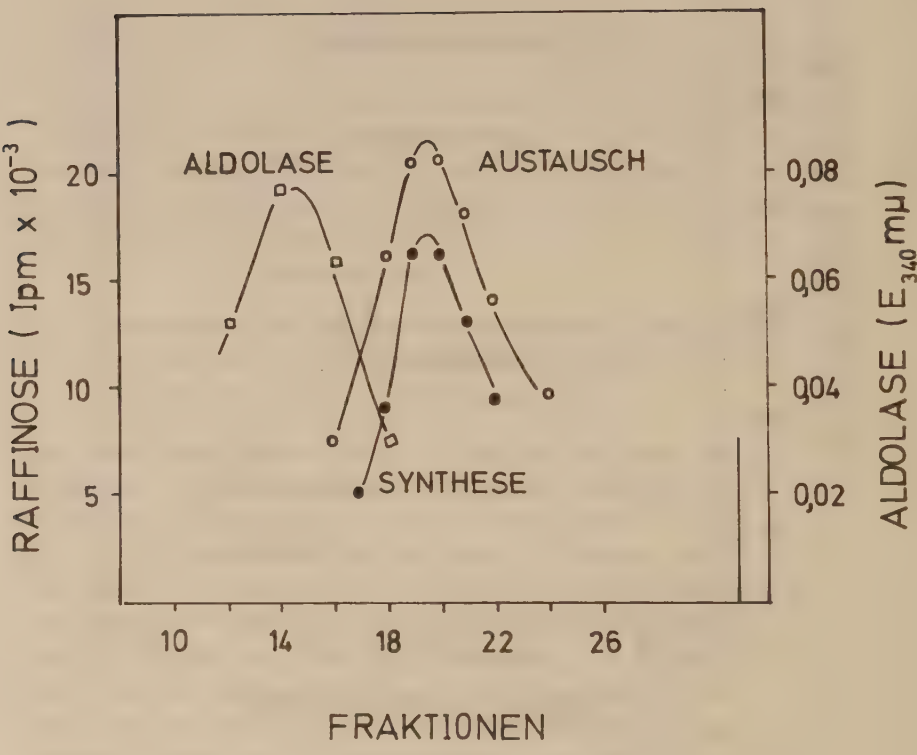


Abb. 16. Bestimmung des Molekulargewichtes der Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase durch Dichtegradientenzentrifugation.
Als Vergleichsprotein wurde Aldolase verwendet.

gradient verwendet wurde. Als Marker diente Aldolase. Es wurde ein Molekulargewicht von 100 000 erhalten, wobei es wiederum gleich war, ob auf Synthese- oder Austauschaktivität getestet wurde (Abb. 16). Die Abweichung gegenüber der Bestimmung an Sephadex könnte entweder an der etwas ungenaueren Methode der Dichtegradientenzentrifugation selbst liegen oder aber an einer unterschiedlichen Konformation des Proteins bei beiden Methoden.

5. Anreicherungsversuche durch Chromatographie auf Hydroxyapatit und deren Problematik

Die bisherige Enzymreinigung erbrachte eine Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber dem Rohextrakt in den besten Fällen um das 100-fache. Reinheitsprüfung mittels Elektrophorese in Polyacrylamidgel (vgl. III.6.) zeigte, daß in der Sephadexfraktion noch mehrere Komponenten enthalten sind.

Manche Fragestellungen können jedoch nur mit einer reineren Proteinfraktion angegangen bzw. gelöst werden. In unserem Fall wäre beispielsweise der eindeutige biochemische Nachweis, ob ein oder zwei Enzyme Synthese- und Austauschreaktion katalysieren, nur über das Vorliegen einer einzigen Proteinspezies möglich.

Es wurde daher eine weitere Anreicherung angestrebt. Als eine in vielen Fällen für die Trennung von Enzymen günstige und auch hier angewandte Methode hat sich in der Praxis eine Chromatographie auf Hydroxyapatit erwiesen. Sie liefert selbst dann noch gute Auflösungen, wenn alle anderen Methoden bereits versagen und kann darüber hinaus die Aufspaltung eines

als schon "homogen" betrachteten Proteins in mehrere Komponenten erbringen. Die Durchführung ist im einzelnen unter Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 12: Chromatographie auf Hydroxyapatit

Fraktion	Synthesereaktion			Austauschreaktion		
	Ges.Akt.		Spez.Akt.	Ges.Akt.		Spez.Akt.
Sephadex	6920	(100)	240	9850	(100)	343
Fraktion III	83	(1.2)	30	907	(9.2)	327
Fraktion IV	1810	(26)	1250	1605	(16.3)	1105

Gesamtaktivität: Ipm x 10^{-3}/Std. und (%)
Spezifische Aktivität: Ipm x 10^{-3}/Std. x mg

Das Ergebnis ist in Tab. 12 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß eine Auftrennung des Sephadexextraktes in zwei aktive Proteinfraktionen, Fraktion III (0.1 M PO_4) und Fraktion IV (0.2 M PO_4), erfolgt, von denen jede, wenn auch in unterschiedlichem Maße, Synthese- und Austauschaktivität besitzt. Der Hauptanteil der Aktivität ist dabei für beide Reaktionen in Fraktion IV zu finden. Demgegenüber weist Fraktion III nicht nur eine geringere Gesamtaktivität auf, sondern zeigt auch bei einem Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von 1:10 für Synthese und Austausch eine ganz andere Verteilung.

Als Ursache für das Auftreten der beiden Proteinfraktionen wurde an folgende 2 Möglichkeiten gedacht:

1) Die beiden Fraktionen sind Isoenzyme, welche sehr ähnliche physikalische Eigenschaften besitzen. Insbesondere müßte dies für den Ladungszustand und das Molekulargewicht zutreffen, da mit den bisher beschriebenen Anreicherungsmethoden keine Trennung erzielt werden konnte. (DEAE-Cellulose- und Sephadexchromatographie!)

2) Fraktion III stellt ein Artefakt dar. Es entstand entweder im Verlauf einer der vorhergehenden Reinigungsschritte oder gar selbst erst während der Chromatographie auf Hydroxyapatit.

Zur Beantwortung der beiden Möglichkeiten wurden Versuche durchgeführt, die allerdings noch keine eindeutige Aussage zulassen, trotzdem aber hier aufgeführt sein mögen.
Wenn Fraktion IV auf Hydroxyapatit in identischer Weise rechromatographiert wurde, so erhielt man ein Eluationsprofil mit nur einem distinkten Proteinpeak, der Synthese- und Austauschaktivität aufwies und bei der gleichen Phosphatkonzentration von der Säule abgetrennt wurde wie zuvor. Da jedoch im Fraktionsbereich III ebenfalls, wenn auch nur eine geringfügige Aktivität gefunden werden konnte (Austauschaktivität $\ll 55\%$ der auf die Säule aufgetragenen Aktivität, vgl. Tabelle 11), kann eine Entstehung von Fraktion III während der Chromatographie nicht völlig ausgeschlossen werden.

Etwas eindeutiger zeichnen sich die Versuche zur Klärung der Frage ab, ob im Verlauf einer der vorherigen Reinigungsschritte bereits eine Auftrennung erfolgte. Mit Sicherheit kann eine Entstehung während der Chromatographie auf DEAE-Cellulose und Sephadex ausgeschlossen werden, da bereits ein durch fraktionierte Ammoniumsulfat-

fällung gewonnener Extrakt Fraktion III und IV nach Hydroxyapatitbehandlung ergibt. Wurde die so erhaltene Fraktion IV erneut einer Anreicherung (Protaminsulfat- und Ammonsulfatfällung) unterworfen und anschließend auf Hydroxyapatit rechromatographiert, so waren ähnliche Verhältnisse wie oben beschrieben zu beobachten. Dies bedeutet aber, daß die Entstehung von Fraktion III mit großer Wahrscheinlichkeit nicht im Verlauf der Anreicherung erfolgt.

Somit dürfte gegenwärtig die erste Möglichkeit, also das Vorliegen zweier Proteine von Anfang an, am ehesten zutreffen. Weitere Versuche zur endgültigen Klärung, bei denen vor allem genaue Aktivitätsbilanzen erstellt werden müssen, sind geplant.

6. Reinheit der Enzympräparation

Die Reinheitsprüfung erfolgte durch analytische Elektrophorese in Polyacrylamidgel. Nach Auftrennung und anschließender Färbung mit Coomasieblau wurden die Banden photographiert bzw. mittels eines Densitometers aufgezeichnet (Abb. 17). Es zeigte sich, daß die Sephadexfraktion noch zahlreiche Proteinbanden aufweist. Die Hydroxyapatitfraktion III besitzt eine Hauptkomponente (A) und etwa 4 weitere schwach angedeutete Banden (B.C.D.E.) Fraktion IV enthält 4 Banden (F.G.H.I.), wobei Bande H der Bande B aus Fraktion III entsprechen dürfte.
Bei den Hydroxyapatitfraktionen III und IV wurde versucht einer der Banden enzymatische Aktivität zuzuordnen. Dabei wurde auf folgende Weise verfahren:

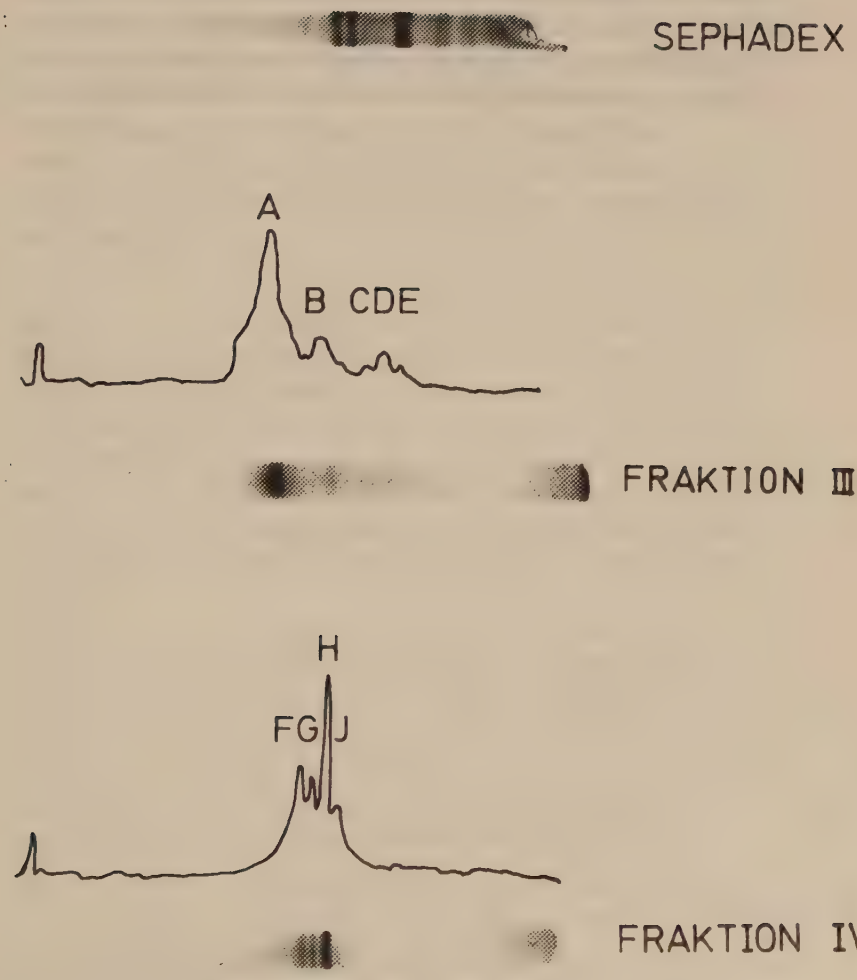


Abb. 7. Polyacrylamidgelelektrophorese der Sephadex-, Hydroxyapatit-III- und Hydroxyapatit-IV-Fraktion

Ein Gel wurde gefärbt und ein parallel dazu verlaufendes in Scheibchen von 2-3mm Dicke zerschnitten. Diese wurden dann mit 0.25 ml Extraktionspuffer in einem Dialysenschlauch zerdrückt und gegen 0.01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, mit 0.02 M DTE dialysiert. Es konnte aber weder Synthese- noch Austauschaktivität trotz genügend eingesetzter Proteinmenge gefunden werden.

IV. SCHLUSSBETRACHTUNG

In den letzten Jahren wurde die Beteiligung des freien myo-Inosits an Transgalaktosidierungsreaktionen und somit erstmals dessen Coenzymfunktion nachgewiesen (58, 59). Die vorliegende Arbeit erbrachte nun auch den Beweis für eine derartige Funktion in der Biosynthese von Raffinose, dem ersten Glied in der homologen Reihe der sogenannten Raffinosefamilie.

Es konnte gezeigt werden, daß Rohextrakte wie auch angereicherte Enzympräparationen aus Weizenkeimlingen und reifen Samen von Vicia faba in vitro die Übertragung des Galaktopyranosylrestes von Galaktinol (L-1-(O-α-D-Galaktopyranosyl)-myo-Inosit) auf Saccharose katalysieren. Als Reaktionsprodukt wurde mittels Papierchromatographie, Elektrophorese, sowie auf Grund enzymatischer Behandlungen Raffinose nachgewiesen.
Galaktinol selbst wird, wie aus Untersuchungen von Frydman und Neufeld (18) hervorgeht, aus UDP-Galaktose und myo-Inosit synthetisiert. Diese enzymatische Aktivität ließ sich auch in den dialysierten Rohextrakten von Vicia faba finden.
Somit kann die Biosynthese von Raffinose durch folgende zwei Gleichungen formuliert werden:

(I) Myo-Inosit + UDP-Galaktose $\longrightarrow$ Galaktinol + UDP
(II) Galaktinol + Saccharose $\rightleftharpoons$ Raffinose + myo-Inosit

Eine direkte Übertragung der Galaktose von UDP-Galaktose auf Saccharose wie sie von Pridham und Hassid (18) sowie Gomyo und Nakamura (20) beschrieben wurde, konnte

dagegen weder mit dem Rohextrakt noch mit dem gereinigten Enzym nachgewiesen werden.

Weiterhin wird aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit offensichtlich, daß das Enzym aus Vicia faba, welches Galaktose von Galaktinol auf Saccharose überträgt, von den in der Literatur beschriebenen α-Galaktosidasen verschieden ist (8, 9, 12, 14, 35, 65).

Einmal kommt dies darin zum Ausdruck, daß im Verlauf der Anreicherung die hydrolytische Aktivität gegenüber p-Nitrophenyl-α-Galaktose, einem typischen Substrat für α-Galaktosidasen, rascher verloren geht, als die Fähigkeit Raffinose zu synthetisieren.
Ferner sei die größere Effektivität der Übertragung auf Saccharose als auf Wasser hervorgehoben. So wurde in Gegenwart von 2×10^{-2} M Saccharose 5 mal mehr Galaktose von Galaktinol übertragen als abhydrolysiert. Wie aus der Literatur hervorgeht (12, 43, 65) findet man aber mit α-Galaktosidasen signifikante Galaktosylübertragungen nur mit Acceptorkonzentrationen von 0.1 bis 1 M.
Die hierbei beobachtete Menge an übertragener Galaktose ist in der Regel selbst dann noch geringer als die durch Hydrolyse freigesetzte. Nicht zuletzt sei die große Spezifität des Enzyms hervorgehoben. Von 10 getesteten Acceptoren erfolgte nur auf Saccharose eine Übertragung von ^{14}C-Galaktinol. Demgegenüber sind α-Galaktosidasen relativ unspezifisch (8, 12, 65).
Es wird daher vorgeschlagen, das Enzym als Galaktinol: Saccharose-6-Galaktosyltransferase zu bezeichnen und es systematisch unter die Glykosyltransferasen (EC 2.4.1.) einzureihen.

Eine weitere interessante Frage war, ob Synthese- und Austauschreaktion von ein- und demselben oder von verschiedenen Enzymen katalysiert werden. Auf Grund von Überlegungen hinsichtlich eines möglichen Enzymmechanismus für die Reaktionen (vgl. III.4.6.) sowie Befunden an der Galaktinol:Raffinose-6-Galaktosyltransferase (58) war die erste Möglichkeit zu favorisieren. Experimentelle Hinweise hierfür ergaben sich aus der guten Korrelation der beiden Reaktionen während der Anreicherung. Keiner der Reinigungsschritte, welche auf den verschiedensten Prinzipien beruhen, vermochte eine Trennung in zwei Proteinspezies herbeizuführen. Identisches Verhalten der beiden Reaktionen war auch im Hinblick auf deren Temperatur- und pH-Abhängigkeit zu beobachten. Das Molekulargewicht einer 100-fach angereicherten Enzympräparation, welches sowohl an Hand der Synthese- als auch Austauschreaktion durch Gelfiltrationen und Dichtegradientenzentrifugation ermittelt wurde, ist ebenfalls jeweils gleich. Unterschiedliches Verhalten dagegen zeigte sich in der Abhängigkeit der Reaktionen von Sulfhydrylgruppen, sowie in der hieraus sich ergebenden Stabilität des Enzyms. Es mußten daher für eine Interpretation in obigem Sinne zusätzlich Annahmen gemacht werden (vgl. III.4.6.). Somit ist aber ein Vorliegen zweier Enzyme noch nicht völlig ausgeschlossen. Der eindeutigste Beweis dafür dürfte erst bei völliger Reinheit der Enzympräparation und gleichzeitiger Katalyse beider Reaktionen zu erbringen sein.

Die Michaeliskonstante für Galaktinol scheint einen relativ hohen Wert zu haben. Sie muß allerdings in Zusammenhang mit dem tatsächlichen Gehalt an Galaktinol in den Samen gesehen werden. Beim Umsatz von Raffinosezuckern in Samen von Phaseolus vulgaris wurde eine Galaktinolkonzentration in der Gegend von 5×10^{-3}M gefunden (60). Sie liegt damit im Bereich

der Halbsättigung der Transferase. In den gleichen Untersuchungen wurde ferner eine Kompartimentierung gefordert, welche sich durch lokale Konzentrationserhöhungen begünstigend auswirken könnte.

Die Transferase weist eine große Labilität auf. Dies und ihr Bedürfnis für starke SH-Schutzgruppen sind möglicherweise eine der Hauptursachen gewesen, daß der erste Schritt in der Biosynthese der Raffinosezucker solange nicht aufgeklärt wurde. Im übrigen ergeben die in diesem Zusammenhang gemachten Beobachtungen zahlreiche Ansatzpunkte für weiterführende Versuche. Beispielsweise könnte an Hand der Aminosäurenanalyse die Titration der SH-Gruppen an einem noch weiter gereinigten Enzym deren Anzahl, Verteilung und Reaktivität bestimmt werden und so ein tieferer Einblick in die unterschiedliche Empfindlichkeit von Synthese- und Austauschreaktion gewonnen werden. Hierzu sei auch noch einmal die experimentell etwas einfachere vorgeschlagene Messung des postulierten Teilschrittes I in Abhängigkeit von SH-Schutzmitteln und SH-Giften erwähnt (III.4.6).

Die in den Samen gefundene Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferaseaktivität ist groß genug, um auch die in vivo-Rate an Raffinose, sowie sämtlicher höherer Homologen, die ja letztlich alle auf Raffinose zurückgehen, während der Reifung zu synthetisieren. Die in 1 g Samen vorhandene Enzymaktivität (vgl. Tabelle 3) vermag bei sättigenden Saccharosekonzentrationen (0.005 M) die gefundene Raffinosemenge in etwa 3 Tagen und die übrigen Zucker innerhalb eines Monats aufzubauen. *

---

* Eine quantitative Bestimmung der Raffinosezucker in reifen Samen von Vicia faba wurde von O. Preuß (unveröffentlicht) durchgeführt und ergab folgende µMol Mengen pro 1 g Samen: Raffinose 2.5, Stachyose 6.1, Verbascose 14.6, Ajugose 0.75.

Wie bei den Untersuchungen an Samen von Phaseolus vulgaris gezeigt werden konnte (60), erhöht sich während der Samenreifung die spezifische Aktivität des Stachyose synthetisierenden Enzyms um das 10-fache, erreicht ihren größten Wert während der Stachyosebildung und fällt bis zum Ende der Reifung wieder um 20% ab. Nimmt man ein ähnliches Verhalten auch für das Raffinose synthetisierende Enzym an, so würden sich die oben ermittelten Zeiten sogar noch verkürzen.

Wie in der Einleitung berichtet wurde, sind die Zucker der Raffinosefamilie im Pflanzenreich weit verbreitet. Manche Arten besitzen nur Raffinose, andere auch Stachyose und wieder andere auch Verbascose. Hierzu sei bemerkt, daß das Auftreten der höheren Glieder der Raffinosefamilie stets an das Vorhandensein der niederen gebunden ist (53). Eine derartige unterschiedliche Zuckerzusammensetzung sollte natürlich auch in einem entsprechenden Enzymmuster zum Ausdruck kommen. Die hier untersuchte Transferase vermag nur Saccharose als Substrat zu erkennen und damit Raffinose zu synthetisieren. Mit einer anderen, ebenfalls aus Vicia faba stammenden Enzympräparation konnte die Synthese von Stachyose und Verbascose katalysiert werden (59). Gleichzeitig wurden bei deren Studium Hinweise erhalten, daß ein- und dasselbe Enzym für die Bildung beider Zucker verantwortlich ist. Somit legen die Ergebnisse nahe, daß im Prinzip lediglich zwei Enzyme an der Biosynthese der Raffinosezucker beteiligt sind. Das eine synthetisiert nur Raffinose, das andere alle weiteren Zucker. Letzteres müßte demnach in den einzelnen Arten eine unterschiedliche Acceptorspezifität aufweisen. Im Samen von Phaseolus vulgaris beispielsweise ist das mengenmäßig stärkste Oligosaccharid die Stachyose, und Verbascose ist nur in Spuren vorhanden. Ein hieraus isoliertes Enzym (57) vermochte Galaktose nur auf Raffinose zu

übertragen - erst eine 8-stündige Inkubation katalysierte auch in geringer Menge Verbascose - und steht damit in gutem Einklang zu der oben geäußerten Vermutung. Es ergibt sich hier somit die interessante Frage, wie sich die Struktur der 3 verschiedenen Enzyme unterscheidet, die alle im Prinzip die gleichen Reaktionen ausführen, sich aber in ihrer Acceptorspezifität wesentlich unterscheiden. Sicherlich dürften hierbei SH-Gruppen wie sie bei dem Raffinose synthetisierenden Enzym gefunden wurden, eine wichtige Rolle spielen.

Die in vitro gewonnenen Ergebnisse über die Biosynthese von Raffinose (diese Arbeit), Stachyose und Verbascose (57, 58, 59) stimmen mit den, in der Einleitung bereits ausführlich dargelegten, in vivo Befunden überein (46, 47, 60). Es kann daher kein Zweifel mehr bestehen, daß die Biosynthese aller Raffinosezucker unter Vermittlung von Galaktinol gemäß der folgenden Gleichung erfolgt:

UDP-Galaktose + myo-Inosit $\longrightarrow$ Galaktinol + UDP
Galaktinol + Saccharose $\rightleftharpoons$ Raffinose + myo-Inosit
Galaktinol + (Gal)-Saccharose $\rightleftharpoons$ (Gal)-Saccharose + myo-Inosit

Wie daraus zu ersehen ist, übernimmt der myo-Inosit die Rolle eines Cofaktors für die Übertragung der Galaktose. Nachdem unlängst die Isolierung eines wasserlöslichen O-α-D-Mannopyranosyl-myo-Inosits aus Hefen gelang (54) ist man versucht zu vermuten, daß myo-Inosit ganz allgemein bei Transglykosidierungsreaktionen beteiligt ist, und es sich bei den Inositglycosiden um eine ähnliche Verbindungsklasse, wenn auch mit einem wesentlich geringeren Gruppenübertragungspotential, handelt wie die Zuckernukleotide. Experimentelle Hinweise hierfür haben sich noch nicht ergeben; im Falle des O-α-D-Mannopyranosyl-myo-Inosits

sprechen sie mittlerweile sogar gegen eine solche Möglichkeit (55). Somit ist die Rolle des myo-Inosits als ein Cofaktor in der Biosynthese der Raffinose-zucker die bisher einzig bekannte solche Funktion dieser Verbindung im Stoffwechsel der Pflanzen.
Die physiologische Bedeutung des Umweges wird gegenwärtig allerdings noch nicht verstanden. Möglicherweise ist er im Zusammenhang mit der verschiedentlich beobachteten Hemmung von α-Galaktosidasen -Enzymen,die für den Abbau der Raffinosezucker verantwortlich sind (45) — durch Inosit und Galaktinol (48, 56) zu sehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Beteiligung von Galaktinol, einem α-Galaktosid des myo-Inosits (L-1-(O-α-D-Galaktopyranosyl)-myo-Inosit) in der Biosynthese von Raffinose nachgewiesen werden.

1) Aus Weizenkeimlingen sowie aus Samen von Vicia faba wurden zellfreie Extrakte erhalten, die Galaktose von Galaktinol auf ^{14}C-Saccharose übertragen. Als Reaktionsprodukt wurde mittels Papierchromatographie, Elektrophorese sowie enzymatischer Behandlungen Raffinose nachgewiesen.

2) Die Extrakte katalysierten auch eine Austauschreaktion des Galaktosylrestes zwischen Raffinose und Saccharose. Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, daß diese Reaktion vom gleichen Enzym katalysiert wird wie die Synthese von Raffinose.

3) Das Enzym aus Vicia faba wurde in 5 Reinigungsschritten auf das 100-fache angereichert. Bei einer weiteren Reinigung auf Hydroxyapatit erfolgte eine Trennung in zwei aktive Fraktionen. In einer davon, Fraktion IV, war die Aktivität 400-fach angereichert.

   Die Reinheitsprüfung durch Elektrophorese in Polyacrylamid ergab, daß die Sephadexfraktion noch mehrere Banden aufwies. Die Hydroxyapatitfraktion IV enthielt 4 Banden.

4) Der Rohextrakt aus den Samen besaß neben der Fähigkeit Galaktose zu übertragen auch eine α-Galaktosidaseaktivität, die sich aber während

der Anreicherung abtrennen ließ. Es wird daher vorgeschlagen, das übertragende Enzym als Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferase zu bezeichnen und es systematisch in die Gruppe der Glykosyltransferasen (EC2.4.1.) einzureihen.

5) Die Transferase zeigte eine sehr große Acceptorspezifität. Von 10 möglichen Acceptoren war nur auf Saccharose eine Übertragung zu beobachten; diese war fünfmal rascher als die Hydrolyse von Galaktinol. Unter den getesteten Donatoren war lediglich mit Galaktinol, α-PNPG und Raffinose eine Übertragung in signifikanter Weise zu beobachten.

6) Die K_m-Werte für Galaktinol und Raffinose betrugen 7×10^{-3}M und 10^{-2}M. Die Michaeliskonstante für Saccharose in der Synthesereaktion wurde als 10^{-3}M bestimmt und ist unabhängig von der Galaktinolkonzentration. Demgegenüber wurde der K_m-Wert für Saccharose in der Austauschreaktion mit zunehmender Raffinosekonzentration schlechter.

7) Das Temperaturoptimum der Umsatzrate der Transferase lag bei etwa 42°C, sowohl in der Katalyse der Synthese- als auch der Austauschreaktion. Das Enzym war unter den verwendeten Versuchsbedingungen bis etwa 44°C stabil. Bei höheren Temperaturen trat in beiden Reaktionen eine rasche Inaktivierung ein. Die Substrate Galaktinol und Raffinose wirkten stabilisierend auf das Enzym, während die Gegenwart von Saccharose keinen Einfluß hatte.

8) Das pH-Optimum der Synthesereaktion lag bei pH 7.0, das der Austauschreaktion bei pH 7.2 .

9) Das Molekulargewicht der Transferase betrug 80000 an Hand analytischer Sephadex G-200 Chromatographie und 100 000 bei Dichtegradientenzentrifugation.

10) Die Transferase zeigte ohne Clelands Reagenz während der Extraktion und Dialyse keine Syntheseaktivität, die Austauschreaktion war dagegen nur um 40% vermindert. Durch spezifische SH-Gruppengifte wie PCMB, NAM und Iodacetamid trat eine Hemmung der katalytischen Aktivität auf. Die Wirkung war für die Synthesereaktion größer als für die Austauschreaktion. Eine Hemmung beider Reaktionen trat auch bei Anwesenheit von Schwermetallionen wie Al^{3+}, Ag^{+}, Hg^{2+} und Zn^{2+} auf.

11) Die in den Samen gefundene Galaktinol:Saccharose-6-Galaktosyltransferaseaktivität reicht aus, um auch die Biosyntheserate in vivo zu klären.

12) Das zeitliche Auftreten der Raffinosezucker während der Samenreifung ist mit deren Biosyntheseweg über Galaktinol vereinbar.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. P. Andrews,
Biochem. J. 91, 222 (1964)

2. R.W. Bailey and E.J. Bourne,
J. Chromatog. 4, 206 (1960)

3. E.J. Bourne, M.W. Walter and J.B. Pridham,
Biochem. J. 97, 802 (1965)

4. R.J. Brown and R.F. Serro,
J. Am. Chem. Soc. 75, 1040 (1953)

5. C.E. Cardini, L.F. Leloir and J. Chiriboga,
J. Biol. Chem. 214, 149 (1955)

6. W. Charlton, W.N. Haworth and W.J. Hickinbottom,
J. Chem. Soc. (London) 1527 (1927)

7. A. Chrambach, R.A. Reisfeld, M. Wyckhoff and J. Zaccari,
Analyt. Biochem. 20, 150 (1967)

8. J.E. Courtois and F. Petek,
in Methods in Enzymology (edited by E.F. Neufeld
and V. Ginsburg) Academic Press, New York 1966,
Vol. 8 p. 565

9. J.E. Courtois,
in Carbohydrate Chemistry of Substances of Biological
Interest (edited by M.L. Wolfrom), Pergamon Press,
London 1959, p. 140

10. J.E. Courtois,
Proc. 5th. Int. Bioch. Meeting 1, 121 (1960)

11. J.E. Courtois, A. Archambault et P.Le Dizet,
Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 1117 (1956)

12. J.E. Courtois et F. Petek,
Bull. Soc. Chim. Biol 39, 715 (1957)

13. J.E. Courtois et A. Wickstrom,
Bull. Soc. Chim. Biol. 32, 759 (1950)

14. P.M. Dey and J.B. Pridham,
Biochem. J. 115, 47 (1969)

15. M. Dixon and E.C. Webb,
Enzymes, Longmans, Green and Co. Ltd. London 1964,
p. 345

16. R.M. Duperon,
C.R. Acad. Sci, Paris 241, 1817 (1955)

17. D. French,
Adv. Carbohydr. Chem. 9, 149 (1954)

18. R.B. Frydman and E.F. Neufeld,
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 12, 121 (1963)

19. L. Glaser,
in Comprehensive Biochemistry (edited by M. Florkin
and F. Stotz), Elsevier Publishing Co.,
Amsterdam 1964, Vol. 15, p. 93

20. T. Gomyo and M. Nakamura,
Agric. Biol. Chem. (Tokyo) 30, 425 (1966)

21. M.F. Gould and R.N. Greenschields,
Nature 202, 108 (1964)

22. S. Hattori and S. Hatanaka,
Bot. Mag. (Tokyo) 71, 417 (1958)

23. H. Herissey, P. Fleury, A. Wickström, J.E. Courtois
et P. Le Dizet,
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1507 (1954)

24. H. Herissey, P. Fleury, A. Wickström, J.E. Courtois
et P. Le Dizet,
Bull. Soc. Chim. Biol. 36 1519 (1954)

25. K. Jeremias,
Planta 52, 195 (1958)

26. K. Jeremias,
Bot. Studien, Heft 15, (1964)

27. E.A. Kabat, D.L. Mac Donald, C.E. Ballou and
H.O.L. Fischer,
J. Am. Chem. Soc. 75, 4507 (1964)

28. O. Kandler,
Ber. dtsch. bot. Ges. 77, 62 (1964)

29. L.F. Leloir, R. Caputto, C.E. Cardini and A.C. Paladini,
J. Biol. Chem. 184, 333 (1950)

30. L.F. Leloir and C.E. Cardini,
J. Biol. Chem. 214, 157 (1955)

31. A.M. Mac Leod,
New Phytol. 56, 210 (1957)

32. J. Levitt,
The Hardiness of Plants, Agronomy, New York 6, (1956)

33. J. Levitt,
Plant Physiol. 32, 237 (1957)

34. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall,
J.Biol. Chem. 193, 265 (1951)

35. O.P. Malhotra and P.M. Dey,
Biochem. J. 103, 739 (1967)

36. R.G. Martin and B.N. Ames,
J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961)

37. N.A. Maximow,
Ib. wiss. Bot. 53, 327 (1914)

38. H.R. Maurer,
Disk Elektrophorese, Walter de Gruyter und Co., Berlin (1968)

39. T. Mizuno and T. Kinpyo,
J. Agric. Chem. 30, 203 (1956)

40. A. Moreno and C.E. Cardini,
Plant Physiol. 41, 909 (1966)

41. K. Nisizawa and J. Hashimoto,
in The Carbohydrates (edited by W. Pigman and D. Horton), Academic Press, New York and London 1970, p. 241

42. J.H. Pazur, M. Shadaksharaswamy and D. Meidell,
Glycine max. Archs. Biochem. Biophys. 99, 78 (1962)

43. F. Petek, E. Villaroya et J.E. Courtois,
Europ. J. Biochem. 8, 395 (1969)

44. J.B. Pridham and W.Z. Hassid,
Plant Physiol. 40, 984 (1965)

45. J.B. Pridham, M.W. Walter and H.G.J. Worth,
Exp. Bot. 20, 317 (1969)

46. M. Senser und O. Kandler,
Z. Pflanzenphysiol. 57, 376 (1967)

47. M. Senser and O. Kandler,
Phytochemistry 6, 1533 (1967)

48. Ch. B. Sharma,
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 43, 572 (1971)

49. T. Shiroya,
Phytochemistry 2, 33 (1963)

50. E.R. Stadtman, G.D. Novelli and F. Lipmann,
J. Biol. Chem. 191, 365 (1951)

51. J. Stanek, M. Cerny and J. Pacak,
The Oligosaccharides, Academic Press, New York
and London, Publishing House of the Szechoslovak
Academy of Science, Prague 1965

52. K. Täufel, K.J. Steinbach und E. Vogel,
Z. Lebensmitteluntersuchung 112, 31 (1960)

53. K. Täufel, A. Täufel und H. Ruttloff,
Planta 58, 127 (1962)

54. W. Tanner,
Z. Pflanzenphysiol. 57, 474 (1967)

55. W. Tanner,
Arch. Mikrobiol. 64, 158 (1968)

56. W. Tanner,
Ann. NY Acad. Sci 165, 726 (1969)

57. W. Tanner and O. Kandler,
Plant Physiol. 41, 1540 (1966)

58. W. Tanner and O. Kandler,
Europ. J. Biochem. 4, 233 (1968)

59. W. Tanner, L. Lehle and O. Kandler,
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 29, 166 (1967)

60. W. Tanner, H. Seifarth und O. Kandler,
Z. Pflanzenphysiol. 58, 369 (1968)

61. K.V. Thimann, J. Craigie, G. Krotkov and K. Cowie,
Am. J. Bot. 45, 295 (1958)

62. W.E. Trevelyan, D.D. Procter and J.S.H. Harrison,
Nature 166, 444 (1950)

63. S. Ueno,
Chem. Abstr. 48, 12242 (1954)

64. A. Wickström, J.E. Courtois et P. Le Dizet,
Bull. Soc. Chim. 827 (1956)

65. Yu-Te Li and M.R. Shetlar,
Arch. Biochem. Biophys. 108, 301 (1964)

66. M.H. Zimmermann,
Science 133, 73 (1961)

67. M.H. Zimmermann,
Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 167 (1960)

68. M.H. Zimmermann,
Planta 32, 288 (1957)

69. M.H. Zimmermann,
Planta 32, 399 (1957)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Tanner am Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Für all die vielseitigen, wertvollen Anregungen und Ratschläge, für seine konstruktive Kritik, sowie für seine stets große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen sei ihm herzlichst gedankt.

Auch Herrn Prof. Dr. O. Kandler gilt mein aufrichtiger Dank. Er gab mir die Anregung zu dieser Arbeit und unterstützte sie in jeder Hinsicht.

Weiterhin möchte ich den Herren Prof. Dr. A. Böck, Dr. H. Kosakowski, K. Stetter und Dr. H. Weber für zahlreiche praktische Hinweise danken.

Herr K. Liedl hat die Gelelektrophorese-Photographien angefertigt. Ihm sei an dieser Stelle hierfür gedankt.

Lebenslauf

Am 3. September 1943 wurde ich, Ludwig Gerhard Lehle, als zweites Kind des Prokuristen Ludwig Lehle und seiner Ehefrau Josefine, geb. Fleischhut in Lindau am Bodensee geboren.

Von 1949 bis 1955 besuchte ich die Volksschulen in Beilngries und Riedenburg. 1955 trat ich in das Christoph-Scheiner-Gymnasium in Ingolstadt über, an dem ich 1964 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Fächer Biologie und Chemie, das ich 1969 mit der Wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien beendete. Seit 1969 bin ich verheiratet.

Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit begann ich im Mai 1969 am Botanischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Tanner. Am gleichen Institut war ich anfangs als wissenschaftliche Hilfskraft, später als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig. Seit Juli 1971 bin ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle in Regensburg.

gedruckt im

SCHNELL DRUCK CENTER

Regensburg, Ostengasse 22, Tel. 0941/90241
mit Verilithfolien auf R 40 Systemautomat